WIRKUNG VON HYALURONAT AUF DIE BILDUNG EXTRAZELLULÄRER LIPASE VON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

KARL-ERICH JÄGER
aus Dortmund

Bochum 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549226_0030

WIRKUNG VON HYALURONAT AUF DIE BILDUNG EXTRAZELLULÄRER LIPASE VON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

der Abteilung für Biologie

an der Ruhr-Universität Bochum

von

KARL-ERICH JÄGER

aus Dortmund

Bochum 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
	ABKÜRZUNGEN	
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1	Bakterien und Phagen	6
2.2	Nährmedien und Puffer	7
2.3	Szintillationscocktails	9
2.4	Geräte	10
2.5	Biologische Methoden	11
2.5.1	Bakterienanzucht und Kurzzeitversuche	11
2.5.2	Anreicherung von Exolipase	11
2.5.3	Isolierung phagenresistenter Mutanten	12
2.5.4	EDTA-Behandlung von Bakterien	13
2.5.5	Messung der Proteinbiosynthese von Bakterien	13
2.5.6	Bindeversuche mit markiertem Hyaluronat	14
2.6	Chemisch-präparative Methoden	16
2.6.1	Methylveresterung von Hyaluronat	16
2.6.1.1	mit Diazomethan	16
2.6.1.2	mit [^{14}C]-Diazomethan	16
2.6.2	Reduktion von Hyaluronat mit Natriumborohydrid	18
2.6.3	Kopplung von Procion-Rot an Hyaluronat	18
2.6.4	Gewinnung von [^{3}H]-Hyaluronat durch Einbau von [^{3}H]-Glucosamin	19
2.6.5	Kovalente Vernetzung von Hyaluronat	22
2.6.6	Kopplung von Hyaluronat-Oligosacchariden an Affi-Gel	22

		Seite
2.7	Chemisch-analytische Methoden	24
2.7.1	D-Glucuronsäure	24
2.7.2	N-Acetyl-D-Glucosamin	24
2.7.3	Hexosamine	25
2.7.4	2-Keto-3-desoxyoctonat	26
2.7.5	Protein	27
2.8	Biochemische und -physikalische Methoden	29
2.8.1	Enzymatischer Partialabbau von Hyaluronat	29
2.8.2	Molekularsiebchromatographie zur Isolierung von Oligosacchariden	30
2.8.3	Viskosimetrie zur Molekulargewichtsbestimmung	31
2.8.4	Affinitätschromatographie an Hyaluronat-Gelen	32
2.9	Enzym-Tests	34
2.9.1	Exolipase	34
2.9.2	Hyaluronidase	34
3.	ERGEBNISSE	36
3.1	Wirkung von Hyaluronat auf die Exolipaseaktivität	36
3.1.1	Natives Hyaluronat	36
3.1.2	Oligosaccharide	38
3.1.2.1	Isolierung und Identifizierung	38
3.1.2.2	Physiologische Wirkung	40
3.1.3	Methylverestertes Hyaluronat	41
3.1.3.1	Charakterisierung des Produkts	41
3.1.3.2	Physiologische Wirkung	42
3.1.4	Reduziertes Hyaluronat	43
3.1.4.1	Charakterisierung des Produkts	43
3.1.4.2	Physiologische Wirkung	44

		Seite
3.2	Interaktion zwischen Hyaluronat und *Pseudomonas aeruginosa*	45
3.2.1	Wirkung von nativem Hyaluronat auf EDTA-vorbehandelte Zellen	45
3.2.2	Wirkung von nativem Hyaluronat auf phagenresistente Mutanten	47
3.2.3	Bindung markierter Hyaluronat-Derivate an die Bakterien	49
3.2.3.1	Herstellung und Charakterisierung von Procion-Rot-Hyaluronat	49
3.2.3.2	Bindeversuche mit Procion-Rot-Hyaluronat	50
3.2.3.3	Herstellung und Charakterisierung von [^{3}H]-Hyaluronat	51
3.2.3.4	Bindeversuche mit [^{3}H]-Hyaluronat	55
3.2.3.5	Herstellung und Charakterisierung von [^{14}C]-Methyl-Hyaluronat	56
3.2.3.6	Bindeversuche mit [^{14}C]-Methyl-Hyaluronat	57
3.3	Chromatographie von Exolipase an Hyaluronat-Gelen	60
3.3.1	Kovalent vernetztes Hyaluronat	60
3.3.2	Hyaluronat-Polyacrylamid-Gel	61
4.	DISKUSSION	63
5.	ZUSAMMENFASSUNG	78
6.	LITERATUR	81

Die vorliegende Dissertation wurde am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum unter Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Winkler in der Zeit von 1979 bis 1982 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. U. Winkler möchte ich sehr herzlich danken, daß er mir einen Arbeitsplatz zur Promotion an seinem Lehrstuhl zur Verfügung stellte und durch seine in jeder Hinsicht großzügige Unterstützung sowie viele fruchtbare Diskussionen die Fertigstellung dieser Dissertation ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. H. Hemetsberger, Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Organische Chemie II, möchte ich danken für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor sowie für seine Unterstützung und viele wertvolle Anregungen betreffend die Methylveresterung von Hyaluronat mit Diazomethan.
Herrn Dipl. Chem. F. Werres danke ich für seine Mithilfe bei einigen Experimenten zur Darstellung von Diazomethan.

Herrn Prof. Dr. K. von Figura, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Physiologische Chemie, danke ich dafür, daß er mir die Möglichkeit gab, in seinem Labor zu experimentieren und durch großzügige finanzielle Unterstützung sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft die Tritium-Markierung von Hyaluronat ermöglichte.
Herrn Dipl. Biol. F. Steckel danke ich für seine Mithilfe bei einigen Experimenten zur Isolierung von Tritium-markiertem Hyaluronat.

Herrn Dipl. Biol. H.W. Schlüter, Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie-Virologie, danke ich für seine Unterstützung bei den Messungen am Spektralfluorimeter.

Frl. G. Strotmann gilt mein besonderer Dank für ihre ausgezeichnete und stets zuverlässige Mitarbeit bei der Durchführung zahlreicher Experimente.

Frl. U. Helle, Frl. M. Will und Frl. G. Kozjek danke ich für die Durchführung von Vorversuchen zu einigen der in dieser Arbeit aufgeführten Experimente.

A B K Ü R Z U N G E N

A. dest.	- destilliertes Wasser
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EU	- Enzymeinheiten (enzyme units)
GlcNAc	- N-Acetyl-D-Glucosamin
GlcUA	- D-Glucuronsäure
HA	- Hyaluronsäure, Kaliumsalz (synonym: Hyaluronat)
HA (H^+)	- Hyaluronsäure, freie Säure
HA_m	- Hyaluronsäure, methylverestert
KDO	- 2-Keto-3-desoxyoctonat
LPS	- Lipopolysaccharid
M 9 glu	- Glucose-Minimalmedium
MNT	- Methyl-N-Nitroso-p-toluolsulfonsäureamid
moi	- Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection)
MW	- Molekulargewicht
NB	- Komplettmedium (Nährbouillon)
NF-units	- Enzymeinheiten (National Formulary units)
O.D.	- Optische Dichte
pfu	- Plaquebildner (plaque forming units)
P_r-HA	- Hyaluronsäure, Procion-Rot markiert

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Pseudomonas aeruginosa ist ein gram-negatives, polar begeißeltes Stäbchen-Bakterium aus der den Enterobacteriales nahe verwandten Familie der Pseudomonales. Als wichtige stoffwechselphysiologische Charakteristika gelten eine positive Oxidase-Reaktion, der Abbau von Zuckern über den Entner-Doudoroff-Weg sowie die Bildung eines blau-grünen Phenazin-Farbstoffes, des Pyocyanins, das gegenüber einer Reihe von gram-positiven und gram-negativen Bakterien antibiotisch wirksam ist (8). Genetische Untersuchungen zeigten die Circularität des Pseudomonas-Chromosoms (62, 112) und das Vorkommen eines breiten Spektrums verschiedener Plasmide aus mindestens zehn verschiedenen Inkompatibilitätsgruppen, die für die Resistenz des Stammes gegen eine Reihe von Antibiotika und sonstige chemische Agenzien, gegen Strahlenschäden, die Fähigkeit zur Degradierung unterschiedlichster organischer Substanzen u.a.m. verantwortlich sind (67). Zunehmende Bedeutung gewinnt Pseudomonas aeruginosa als fakultativ humanpathogener Keim, wobei insbesondere Personen mit hämatologischen Erkrankungen oder solche, die mit Immunsupressiva behandelt werden, der Gefahr einer Infektion ausgesetzt sind. Die durch Pseudomonas hervorgerufenen Krankheitsbilder reichen von Wundinfektionen, vor allem von Verbrennungswunden, über Infektionen der Hirnhaut, des Mittelohres, der Lungen und der Harnwege bis hin zur Sepsis (69). Mucoide Stämme können aus dem Sputum von Patienten isoliert werden, die an Pankreas-Fibrose (Mucoviszidose) leiden (85). Von entscheidender Wichtigkeit für die pathogenen Eigenschaften sind neben Bestandteilen der Zelloberfläche (43, 65) extrazelluläre Produkte, die Pseudomonas aeruginosa in das umgebende Medium ausscheidet. Hierzu gehören das Exotoxin A (89) und das Exoenzym S (123), zwei Hämolysine (15), ein aus Exopolysaccharid isoliertes Glykolipoprotein (34, 80, 81) sowie als weitere extrazelluläre Enzyme Proteasen (Collagenase, Elastase, Gelatinase), Lecithinase, Desoxyribonuclease und Lipase (63, 69, 120, 140, 141).

Extrazelluläre oder Exolipasen (Glycerol-Ester-Hydrolasen, E.C. Nr. 3.1.1.3) nehmen unter den mikrobiellen Exoenzymen i sofern eine Sonderstellung ein, als sie ihre enzymatische Wi kung an der Grenzfläche zwischen wäßriger Lösung und dem dar emulgierten Substrat (z. B. den Lipiden) ausüben. Die sich a dieser Tatsache ergebenden experimentellen Probleme, besonde bei kinetischen Untersuchungen, sind in (131) diskutiert. Au von Pseudomonas aeruginosa (45, 96) und Pseudomonas fluoresc (4) sind Exolipasen einer Reihe anderer Mikroorganismen part gereinigt und charakterisiert worden. Hierzu gehören z. B. d gram-negativen Bakterien Serratia marcescens (111) und Escherichia coli (97, 106), die gram-positiven Bakterien Staphylococcus aureus (13, 14, 73), Bacillus subtilis (77) u Propionibacterium acnes (64) sowie die Pilze Rhizopus arrhiz (127), Rhizopus japonicus (3), Aspergillus niger und Geotrichum candidum (102). Die Eigenschaft vieler Lipasen, intra- und intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen einzu gehen, wird neuerdings durch Verwendung von Gelmatrices mit hydrophoben Liganden zur Reinigung ausgenutzt (74). Die wohl meistuntersuchte Lipase aus Säugern ist die Lipoprotein Lipa ein Glykoprotein, das aus Blutplasma isoliert werden kann un ein Molekulargewicht von 67 000 besitzt (6, 10, 11). Heparin ein Polysaccharid aus der Gruppe der im tierischen Gewebe vo kommenden Glycosaminoglycane, kann an die Lipoprotein Lipase binden und deren enzymatische Aktivität erhöhen (12).

Hyaluronat ist ein ubiquitärer Bestandteil der extrazellulär Matrix des Bindegewebes und kann u.a. aus Nabelschnüren, aus der Synovialflüssigkeit und aus Augäpfeln isoliert werden (1 Es ist das einzige nicht sulfatierte der im menschlichen und tierischen Bindegewebe vorkommende Polysaccharide, die als Glycosaminoglycane bezeichnet werden. Ein Überblick über der physiologische Funktion findet sich in (31). In der Zellhüll von Streptococcen der Gruppe A ist ebenfalls Hyaluronat vorhanden (125); es wird ihm dort eine Rolle bei der Resistenz der Bakterien gegen Wasserstoffperoxid zugeschrieben (27). Exopolysaccharide von Pseudomonas aeruginosa enthalten bis zu 5 % Hyaluronat (20).

Hyaluronat ist ein unverzweigtes Polysaccharid vom Molekulargewicht 1 - 6 x 10^6, das aus alternierenden N-Acetyl-β-D-Glucosamin (GlcNAc)- und β-D-Glucuronsäure (GlcUA)-Bausteinen besteht, die über β-1-3-glucuronidische und β-1-4-glucosaminidische Bindungen verknüpft sind (91) (siehe Abb. 1).

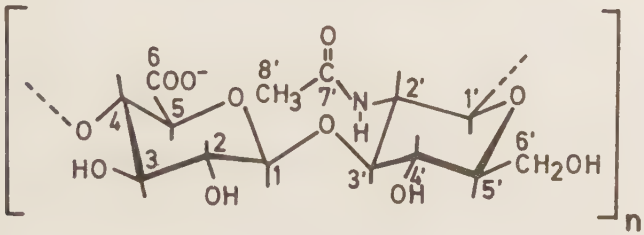

Abb. 1: Disaccharid-Einheit von Hyaluronat (nach 98)
Die C-Atome der D-Glucuronsäure tragen die Nummern 1-6, die des N-Acetyl-D-Glucosamins die Nummern 1'-8'. Die Pyranose-Ringe sind in der Sessel-Konformation dargestellt.

Die freie Säure (Hyaluronsäure) sowie deren einfache Salze (K- oder Na-Hyaluronat) können geordnet helicale Konformationen einnehmen, wobei die bevorzugte Form möglicherweise eine Doppelhelix aus zwei antiparallel verlaufenden Kettenmolekülen ist (51, 117, 138, 139). In wäßriger Lösung nimmt Hyaluronat eine sogenannte "random coil"-Struktur ein, in der, wie aus Perjodat-Oxidations-Kinetik und Kernresonanz-Spektren geschlossen wurde, sowohl versteifte wie flexible Domänen vorkommen (114, 115, 133). Die hohe Viskosität solcher Lösungen von Hyaluronat läßt auf spezifische intermolekulare Wechselwirkungen schließen (95, 132).

Über den Mechanismus der Biosynthese von Hyaluronat ist wenig bekannt. Untersuchungen an Streptococcen zeigten, daß ein membrangebundener Syntheseapparat noch unbekannter Zusammensetzung offenbar die Uridindiphosphat-Derivate der Hyaluronat-Monosaccharid-Einheiten (UDP-GlcUA und UDP-GlcNAc) verknüpft und schließlich fertige Hyaluronat-Kettenmoleküle freigesetzt werden (125).

Die Behandlung einer Zellsuspension von Pseudomonas aeruginosa mit Hyaluronat führt zu einer deutlichen Erhöhung der Aktivität extrazellulärer Lipase (113). In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, den Mechanismus dieser physiologischen Wirkung von Hyaluronat näher zu charakterisieren. In früheren Untersuchungen (Jäger, K.E., Winkler, U.K., unveröffentlicht) war folgendes gefunden worden:

1. Pseudomonas aeruginosa kann natives Hyaluronat nicht als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Von den Monosaccharideinheiten des Hyaluronats kann nur N-Acetyl-Glucosamin genutzt werden.

2. Der verwendete Pseudomonas aeruginosa-Stamm scheint kein Hyaluronat-abbauendes Enzym zu synthetisieren. Bei Untersuchungen von Bakteriensuspensionen und zellfreien Überständen mit drei unterschiedlichen Methoden (siehe 2.9.2) konnte keine Hyaluronidase-Aktivität festgestellt werden. Das Ergebnis steht im Einklang mit publizierten Untersuchungen (69, 122, 140).

3. Bei der Hyaluronat-bedingten Stimulation der Aktivität extrazellulärer Lipase ist das Polysaccharid selbst die wirksame Komponente. In Hyaluronat-Präparaten in geringer Menge enthaltenes Chondroitinsulfat, Protein sowie einwertige und zweiwertige Kationen (vor allem K^+, Na^+ und Ca^{++}, Mg^{++}) führen im verwendeten Versuchssystem nicht zu einer Erhöhung der Aktivität extrazellulärer Lipase.

4. Voraussetzung für die physiologische Wirksamkeit von Hyaluronat ist die Anwesenheit von Bakterien. Zellfreie Exolipase wird in ihrer Aktivität durch Hyaluronat nicht beeinflußt.

Auf der Grundlage dieser Befunde sollte zunächst unter Verwendung von biochemisch- und enzymatisch modifiziertem Hyaluronat untersucht werden, welche strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Hyaluronat-Moleküls für dessen physiologische Wirksamkeit auf Pseudomonas aeruginosa wesentlich sind. Im Anschluß daran war die Frage zu beantworten, ob Hyaluronat in der Lage ist, mit der äußeren Membran von Pseudomonas aeruginosa zu interagieren. Hierzu sollte einerseits die physiologische Wirksamkeit nativen Hyaluronats gegenüber Bakterien mit mutativ veränderter äußerer Membran geprüft werden, andererseits war, unter Verwendung markierter Hyaluronat-Derivate, zu untersuchen, ob das Polysaccharid an die Bakterien bindet. Mit affinitätschromatographischen Methoden sollte schließlich versucht werden, Hinweise für eine Interaktion zwischen Hyaluronat und extrazellulärer Lipase von Pseudomonas aeruginosa zu finden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterien und Phagen

Stamm	Eigenschaften	Herkunft (Literatur)
Bakterien		
Pseudomonas aeruginosa	Wildtyp	American Type Culture Collection Nr. 9027
(Laborbezeichnung: B 104)		
Pseudomonas aeruginosa	Wildtyp	R.E.W. Hancock (9
(Laborbezeichnung: H 103)		
Phagen	*P. a.* H 103 als Wirt	R.E.W. Hancock (9
7	Protein-Rezeptor	
21	Protein-Rezeptor	
109	LPS-Rezeptor	
2	Protein- oder	
B5A	LPS-Rezeptor	

Tab. 1: Bakterien und Phagenstämme

2.2 Nährmedien und Puffer

Alle Medien wurden 15 min bei 1 atü autoklaviert.

Bouillon (NB)-Medium

8 g Bouillonpulver (Difco)
4 g NaCl
ad 1 000 ml A. dest.

Bouillon (NB)-Agar

15 g Agar-Pulver
ad 1 000 ml NB-Medium

Bouillon (NB)-Weichagar

5 g Agar-Pulver
ad 1 000 ml NB-Medium

Glucose-Minimalmedium (M 9 glu)

Lösung 1:	4 % (w/v) Glucose in A. dest.	(5.0 ml)
Lösung 2:	0.1 M $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	(0.5 ml)
Lösung 3:	0.01 M $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	(0.5 ml)
Lösung 4:	A. dest.	(37.5 ml)
Lösung 5:	0.4 M $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	(5.0 ml)
	0.2 M KH_2PO_4	
	0.03 M NaCl	
	0.19 M NH_4Cl	

Nach getrenntem Autoklavieren wurden die in Klammern angegebenen Volumina vermischt. Das Medium wurde supplementiert durch Zugabe von 0.63 ml einer 20 %-igen Lösung von Casamino acids (Difco).

Tris-HCl-Puffer

Die folgenden Puffer wurden mit 1 N HCl auf die angegebenen pH-Werte eingestellt und mit A. dest. auf 1 000 ml aufgefüllt.

- 10 mM , pH = 8.0
  1.21 g Tris (Trishydroxymethylaminomethan, Merck)

- 66 mM , pH = 7.5
  8.08 g Tris

- 50 mM , pH = 7.5 mit 0.1 M NaCl
  6.06 g Tris
  5.84 g NaCl

Phosphat-Puffer

Die folgenden Puffer wurden mit 1 N KOH auf die angegebenen pH-Werte eingestellt und mit A. dest. auf 1 000 ml aufgefüllt.

- 3 mM , pH = 6.3
  0.4 g KH_2PO_4

- 10 mM , pH = 7.2 mit 0.15 M NaCl
  1.36 g KH_2PO_4
  8.77 g NaCl

- 10 mM , pH = 7.2 mit 1.4 M NaCl
  1.36 g KH_2PO_4
  81.82 g NaCl

- 20 mM , pH = 7.0 mit 70 mM NaCl, 30 mM $MgSO_4$
  3.56 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
  2.72 g KH_2PO_4
  4.09 g NaCl
  0.74 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer

0.79 g NH_4HCO_3 ad 1 000 ml A. dest.

Pyridin-Acetat-Puffer , pH = 5.0

22.15 g Pyridin
15.01 g Eisessig ad 1 000 ml A. dest.

Ringer-Puffer, pH = 7.4

8.70 g NaCl
0.23 g KCl
0.24 g $CaCl_2$
2.60 g $NaHCO_3$
0.60 g Binotal (Bayer) ad 1 200 ml A. dest.

Durch Begasung mit CO_2 wurde der Puffer auf pH = 7.4 eingestellt.

Papain-Puffer, pH = 4.5

13.60 g Natriumacetat
1.86 g EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz, Merck)
0.88 g Cysteinhydrochlorid ad 1 000 ml A. dest.

Lipase-Puffer, pH = 8.0

8.41 $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
0.37 g KH_2PO_4 ad 1 000 ml A. dest.

Hyaluronidase-Puffer, pH = 5.3

13.80 g $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$
8.77 g NaCl ad 1 000 ml A. dest.

Der Puffer wird mit 1 N HCl auf pH = 5.3 eingestellt.

.3 Szintillationscocktails

Standardszintillator

4.0 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)
0.1 g 1,4-Bis (5-phenyloxazol-2-yl)-benzol (POPOP)
ad 1 000 ml Toluol

Szintillator zur Zählung wäßriger Proben

5.5 g PPO
0.1 g POPOP
677 ml Toluol
333 ml Triton X-100

Die radioaktiven Proben wurden in 10 ml des jeweiligen Szintillators gezählt.

2.4 Geräte

Zentrifugen

- Kühlzentrifuge Sorvall R2-58 mit den Rotoren SS 34, GSA und GS 3
- Ultrazentrifuge Kontron TGA-65 mit dem Rotor 60 Ti
- Tischzentrifuge Eppendorf (max. 15 000 xg)
- Tischzentrifuge Christ (max. 3 000 xg)

Meßgeräte

- Spektralphotometer Zeiss PMQ II
- Spektralfluorimeter Jobin Yvon 3 D
- Liquid-Scintillation-Spectrometer Packard-Tri-Carb 2425
- Differential-Refraktometer Winopal Lamidur 78

Fraktionssammler LKB-Multirac

Kompensationsschreiber Kontron W + W 3212

Gefriertrocknung WKF L 2

5 Biologische Methoden

5.1 Bakterienanzucht und Kurzzeitversuche

Pseudomonas aeruginosa 8 104 wurde auf NB-Agar-Stammplatten im Kühlschrank aufbewahrt. Die Bebrütung von Bakteriensuspensionen erfolgte immer bei 30° C. Übernachtkulturen wurden hergestellt durch Beimpfen von NB-Medium (im allgemeinen 3 x 10 ml) mit Bakterien und anschließende Bebrütung im Rollapparat für 16 h. Nach Zentrifugation (10 min bei 6 000 xg) wurden die Zellen in 2 ml M 9 glu-Medium resuspendiert und 30 ml M 9 glu-Medium mit einer Anfangszelldichte von 3×10^8 Zellen/ml (entspricht $O.D._{580} = 0.5$) beimpft. Die Kultur wurde für 4 h im Schüttelwasserbad bebrütet (Endzelldichte ca. 5×10^9 Zellen/ml). Nach Zentrifugation wurden die Zellen in zwei Drittel des ursprünglichen Volumens 66 mM Tris-Puffer resuspendiert und definierte Volumina (0.5 - 1 ml) in die sogenannten Kurzzeitversuche eingesetzt.

Unter "Kurzzeitversuchen" werden maximal 60 min dauernde Experimente verstanden, bei denen die physiologische Wirkung von Hyaluronat bzw. dessen Derivaten auf Zellsuspensionen von Pseudomonas aeruginosa (s. o.) untersucht wurde. Definierte Volumina der Zellsuspension wurden mit gleichen Volumina 66 mM Tris-Puffer versetzt, in dem variable Konzentrationen von Hyaluronat bzw. dessen Derivaten gelöst waren. Die Suspensionen wurden im Schüttelwasserbad bebrütet, zu den jeweils angegebenen Zeiten wurden Proben von 0.2 ml entnommen. Diese wurden zentrifugiert (4 min bei 15 000 xg), 0.1 ml Überstand entnommen, im Eisbad aufbewahrt und später in den Test zur Bestimmung der Aktivität extrazellulärer Lipase eingesetzt.

5.2 Anreicherung von Exolipase

4 x 200 ml NB-Medium in Erlenmeyer-Kolben (Volumen: 1 l) wurden mit Pseudomonas aeruginosa 8 104 beimpft und für 16 h bebrütet, 10 min bei 8 000 xg zentrifugiert und die Sedimente

in 6 x 20 ml M 9 glu-Medium resuspendiert. 4 x 500 ml M 9 glu-Medium in Erlenmeyer-Kolben (Volumen: 2 l) wurden mit dem Resuspendat beimpft (Anfangszelldichte: 3 x 10^8 Zellen/ml) und 4 h geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 min bei 8 000 xg) wurden die Sedimente in 2 x 500 ml 66 mM Tris-Puffer resuspendiert, für 30 min bebrütet, 10 min bei 8 000 xg und die Überstände erneut 10 min bei 16 000 xg zentrifugiert. Die Überstände nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden bei 4^0 C gegen 5 x 20 l 10 mM NH_4HCO_3-Puffer für 72 h dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde auf Gehalt an Protein und Exolipaseaktivität untersucht.

2.5.3 Isolierung phagenresistenter Mutanten

Die Vermehrung (in einer Flüssigkultur des Wirtsstammes Pseudomonas aeruginosa H 103) und die Titerbestimmung (mit der Weichagar-Gußplatten-Methode) der verwendeten Phagen erfolgten nach Standardmethoden (2). Die Titer der verwendeten Phagensuspensionen betrugen 0.5 - 5 x 10^{10} pfu/ml). Zur Isolierung resistenter Mutanten wurde eine Übernachtkultur von Pseudomonas aeruginosa B 104 10^{-6}-fach verdünnt, auf NB-Agar-Platten gespatelt und für 24 h bebrütet. Von den entstandenen Einzelkolonien wurden zehn ausgewählt und numeriert. Zunächst wurde von jeder der ausgewählten Einzelkolonien eine Nachkultur auf NB-Agar angelegt (Klon Nr. 1-10), dann je 0.2 ml NB-Medium beimpft und für 3 h im Rollapparat bebrütet (Endzelldichte: 2 x 10^8 Zellen/ml). Zu jeder Kultur wurde 0.1 ml Phagensuspension gegeben (moi = 50) und zur Präadsorption für weitere 10 min bebrütet. Danach wurde die Suspension zu 2 ml Weichagar (45^0 C) pipettiert, durchmischt und auf NB-Agar plattiert. Zur Kontrolle der Sterilität einer jeden Phagensuspension wurden jeweils zwei Agar-Platten mit Phagensuspension in Weichagar ohne Bakterien angelegt. Nach 24 h Bebrütung wurden von jeder Platte je zwei resistente Kolonien abgeimpft, zwei aufeinanderfolgenden Einzelkolonie-Passagen auf NB-Agar unterzogen und anschließend auf Resistenz gegen die fünf verwendeten Phagen geprüft.

5.4 EDTA-Behandlung der Bakterien

Bakteriensuspensionen (siehe 2.5.1) wurden nach 4 h Bebrütung in M 9 glu-Medium zentrifugiert, in der Hälfte des Ausgangsvolumens 66 mM Tris-Puffer resuspendiert und mit verschiedenen Konzentrationen EDTA (0.1 - 0.5 mM Endkonzentration) versetzt. Nach 5 min Bebrütung im Schüttelwasserbad wurden die Proben erneut zentrifugiert (10 min bei 6 000 xg); die Überstände wurden auf ihren Gehalt an KDO und Protein getestet. Die Sedimente wurden in der Hälfte des ursprünglichen Volumens 66 mM Tris-Puffer resuspendiert und aliquote Teile in einen Kurzzeitversuch eingesetzt. Nach jeder EDTA-Behandlung wurden Proben entnommen und der Keimtiter auf NB-Agar bestimmt.

In einigen Experimenten wurden Bakteriensuspensionen unmittelbar nach Behandlung mit 0.2 mM EDTA mit $MgCl_2$ (1 mM Endkonzentration) versetzt und für weitere 15 min im Schüttelwasserbad bebrütet. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben.

5.5 Messung der Proteinbiosynthese von Bakterien

Unter Bedingungen eines Kurzzeitversuches (siehe 2.5.1) wurden je 5 ml Bakteriensuspension in 66 mM Tris-Puffer in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von Hyaluronat mit insgesamt 50 µl einer Lösung aus L-[U-^{14}C]-Prolin (Amersham Buchler CFB 71, spezifische Aktivität: 275 mCi/mMol) und L-Prolin (Merck) versetzt. Die Endkonzentrationen pro ml Testansatz betrugen 0.25 µCi [^{14}C]-Prolin und 20 µg Prolin. Die Suspensionen wurden im Schüttelwasserbad bebrütet; in Abständen von 5 bzw. 10 min wurden jeweils 0.5 ml entnommen und in 1 ml eiskalte 10 % (w/v) Trichloressigsäure pipettiert. Nach 30 min Stehen im Eisbad wurden die Proben über Membranfilter (Sartorius, Porengröße 0.45 µm) abgesaugt, mit 2 x 5 ml eiskalter 5 % (w/v) Trichloressigsäure nachgewaschen, die Membranfilter unter Infrarotlicht getrocknet und in Standardszintillator die [^{14}C]-Radioaktivität pro Filter bestimmt. In

einigen Versuchen wurden die Bakteriensuspensionen für 20 min in Anwesenheit von [^{14}C]-Prolin vorinkubiert, dann gleiche Volumina 66 mM Tris-Puffer bzw. Hyaluronat-Lösung zugesetzt und wie beschrieben weiterverfahren.

2.5.6 Bindeversuche mit markiertem Hyaluronat

Filtrationsmethode

Pseudomonas aeruginosa wurde wie beschrieben angezogen und in 66 mM Tris-Puffer suspendiert (siehe 2.5.1). Jeweils 0.6 ml Bakteriensuspension verschiedener Zelldichte wurden mit je 0.6 ml 66 mM Tris-Puffer vermischt, der 80 µg [^{14}C]-Methyl - Hyaluronat (HA_m), enthielt, so daß die Endzelldichten 0.5 - 1 x 10^9 Bakterien/ml betrugen. Die Suspensionen wurden für 15 min unter Schütteln inkubiert, als Kontrolle 0.1 ml zur Bestimmung der [^{14}C]-Radioaktivität entnommen und anschließend je 1 ml über einen Durapore-Membranfilter (Millipore, Porengröße 0.25 µm) abgesaugt. Nach Waschen mit 2 x 5 ml 66 mM Tris-Puffer und Trocknen der Membranen unter Infrarotlicht wurde die [^{14}C]-Radioaktivität pro Filter in Standardszintillator bestimmt. Zur Bestimmung der unspezifisch an die Membranfilter gebundenen [^{14}C]-Radioaktivität dienten jeweils zwei Versuchsansätze, die statt der Bakteriensuspension 66 mM Tris-Puffer enthielten.

Zentrifugationsmethode

Pseudomonas aeruginosa wurde wie beschrieben angezogen und in 66 mM Tris-Puffer suspendiert (siehe 2.5.1). Je 0.6 ml Bakteriensuspension konstanter Zelldichte wurden mit je 0.6 ml 66 mM Tris-Puffer versetzt, der verschiedene Konzentrationen markierten Hyaluronats enthielt. Die Endkonzentrationen pro ml Testansatz lagen im Bereich von 1 - 4 mg für Procion-Rot-Hyaluronat (P_r-HA), 4 - 12 mg für [^{3}H]-markiertes Hyaluronat ([^{3}H]-HA) und 0.25 - 1 für [^{14}C]-HA_m. Die Suspensionen wurden für 15 min unter Schütteln

bebrütet; dann wurde aus denjenigen Proben, die radioaktives Hyaluronat enthielten, als Kontrolle jeweils 0.1 ml zur Bestimmung der [^{14}C]-Radioaktivität entnommen. Jeweils 2 x 0.5 ml aus jeder Suspension wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorsichtig auf je 1 ml 50 % (w/v) Saccharose-Lösung geschichtet, zentrifugiert (10 min bei 15 000 xg) und die Überstände mit einer Schlauchpumpe abgesaugt. Die Radioaktivität enthaltenden Sedimente wurden in 50 µl 66 mM Tris-Puffer resuspendiert und in Szintillator für wäßrige Proben gezählt. Als Kontrolle dienten Sedimente von Versuchsansätzen, die kein radioaktiv markiertes Hyaluronat enthielten. Die vertikale Verteilung des radioaktiven Materials in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen in Abwesenheit von Bakterien wurde ermittelt, indem jeweils 0.5 ml einer Lösung markierten Hyaluronats in 66 mM Tris-Puffer wie oben beschrieben zentrifugiert, anschließend 15 x 0.1 ml Überstand entnommen und die Radioaktivität bestimmt wurde.

Die Sedimente, die P_r-HA enthielten, wurden in jeweils 0.1 ml 20 mM Phosphat-Puffer resuspendiert, zu 0.9 ml desselben Puffers gegeben und die Fluoreszenz im Spektralfluorimeter bestimmt. Als Kontrolle dienten Sedimente aus Versuchsansätzen, in denen Bakterien ohne P_r-HA bebrütet wurden. Parallelversuche wurden durchgeführt mit Bakteriensuspensionen, die in Gegenwart von P_r-Dextran statt P_r-HA inkubiert wurden. Zur quantitativen Abschätzung der Menge von zellgebundenem P_r-HA wurden Standardkurven aufgenommen: Es wurde die Fluoreszenz von P_r-HA-Lösungen in 20 mM Phosphat-Puffer im Konzentrationsbereich von 1 - 10 µg/ml bestimmt. Alle Fluoreszenzmessungen erfolgten bei einer Excitationswellenlänge von 366 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm.

2.6 Chemisch-präparative Methoden

2.6.1 Methylveresterung von Hyaluronat

2.6.1.1 mit Diazomethan

Durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 WX 8 (Serva, H^+-Form) wurde Hyaluronat (Hyaluronsäure-Kaliumsalz, Serva) in die Form der freien Säure überführt. Jeweils 50 mg HA (H^+) wurden mit 2 ml Ether befeuchtet und für 2 h mit zehnfachem Überschuß an Diazomethan behandelt. Diazomethan wurde hergestellt durch Verseifung von 1 g Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonsäureamid in etherischer Lösung mit 50 % (w/v) KOH-Lösung. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ether durch Destillation am Rotationsverdampfer entfernt, das Produkt in A. dest. gelöst und lyophilisiert. Zur Bestimmung des Methylester-Gehaltes wurde eine C-H-Analyse herangezogen (ausgeführt vom Mikroanalytischen Laboratorium J. Beetz, Kronach).

2.6.1.2 mit [^{14}C]-Diazomethan

Zur Markierung mit [^{14}C]-Diazomethan wurde die in Abb. 2 dargestellte Mikroapparatur verwendet. 32 µMol (= 6.9 mg) Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonsäureamid, [N-Methyl-^{14}C] (New England Nuclear NEC 282, spezifische Aktivität: 7.8 mCi/mMol) wurden im Vorlagekolben in 0.5 ml Ether gelöst, 0.5 ml Diethylenglykolmonoethylether als Phasenvermittler zugegeben und das Gemisch im Eisbad gekühlt. Im Reaktionskolben wurden 20 mg HA-(H^+) (gewonnen durch zweimalige Ionenaustauschchromatographie von Hyaluronat an Dowex 50 WX 8) mit 2 ml getrocknetem Ether versetzt. Dieser wurde gewonnen durch Behandlung mit $CaCl_2$ für 48 h, Filtration, Kochen am Rückfluß über Natriumdraht für 3 h und anschließende Destillation. Der Reaktionskolben wurde in einer Lösung aus Ether und flüssigem Stickstoff auf -110° C gekühlt. Durch die Apparatur wurde gasförmiger Stickstoff geleitet (ca. 10 Blasen/min). Die Reaktion wurde gestartet durch

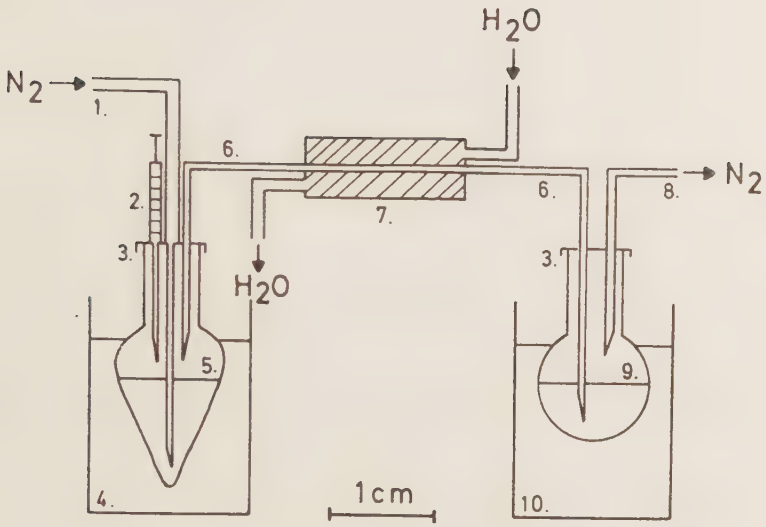

Abb. 2: Apparatur zur Markierung von Hyaluronat mit [^{14}C]-Diazomethan

1. Edelstahlnadel zur Einleitung von N_2-Gas
2. Spritze mit Kanüle zur Einbringung von KOH
3. Diaphragmen zum Verschluß der Kolben
4. Wasserbad, auf 40° C temperiert
5. Vorlagekolben (10 ml-Spitzkolben) zur Freisetzung von Diazomethan aus MNT
6. Edelstahlnadel als Verbindung zwischen Vorlage- und Reaktionskolben
7. Kühlmantel, von auf 4° C abgekühltem Wasser durchflossen
8. Edelstahlnadel als Auslaß für N_2-Gas
9. Reaktionskolben (10 ml-Rundkolben) zur Veresterung von Hyaluronat mit Diazomethan
10. Dewar-Gefäß, gefüllt mit N_2(l)-Ether (-110° C)

Zugabe von 50 µl 50 % (w/v) KOH-Lösung und Aufwärmen des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur. Nach 15 min war das entstandene [^{14}C]-Diazomethan in den gekühlten Reaktionskolben übergetrieben. Das Reaktionsgemisch im Vorlagekolben wurde für 5 min auf 40° C erwärmt, dann die Verbindung zwischen Reaktions- und Vorlagekolben unterbrochen, der Reaktionskolben auf 4° C erwärmt und über Nacht magnetisch gerührt. Nach Abdampfen des Ethers wurde das Produkt im Stickstoffstrom getrocknet. Durch Auswaage und Szintillationszählung einer wäßrigen Lösung des Produkts (Konzentration 1 mg/ml) wurde die Ausbeute bestimmt.

2.6.2 Reduktion von Hyaluronat mit Natriumborohydrid

Durch Behandlung einer Hyaluronat-Lösung mit Hyaluronidase (siehe 2.8.1 - Probe 1) wurde ein Hyaluronat-Präparat mit erhöhter Zahl reduzierender terminaler N-Acetyl-Glucosamin-Reste isoliert. Eine Lösung dieses Präparates in A. dest. (10 mg/ml) wurde mit Natriumborohydrid versetzt (2.5 M Endkonzentration). Nach 3 h Stehen bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit Eisessig neutralisiert und durch Chromatographie über Sephadex G-25 (Pharmacia) entsalzt. Fraktionen, die reduziertes Hyaluronat enthielten, wurden refraktometrisch ermittelt, vereinigt und das Produkt durch Lyophilisierung gewonnen. 50 mg des reduzierten Produkts wurden erneut der beschriebenen Behandlung mit Hyaluronidase unterworfen. Nach jedem Reaktionsschritt wurde der Gehalt der Probe an reduzierenden, terminalen N-Acetyl-Glucosamin-Resten bestimmt (siehe 2.7.2).

2.6.3 Kopplung von Procion-Rot an Hyaluronat

100 mg Hyaluronidase-behandeltes Hyaluronat (siehe 2.8.1 - Probe 2) wurden in 5 ml A. dest. gelöst; 200 mg NaCl und 10 mg Procion-Rot (Procion Brilliant Rot M-2 B, Serva) wurden zugesetzt und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur magnetisch gerührt. Dann wurden 15 mg Na_2CO_3 zugesetzt (pH = 10) und die Lösung über Nacht weitergerührt. Nach 24 h Dialyse gegen 3 x 3 l A. dest. wurde das Produkt durch Chromatographie über

Sephadex G-25 isoliert. Hierzu wurden 40 g Sephadex-Gel in 200 ml A. dest. suspendiert, für 1 h bei 90° im Wasserbad vorgequollen und in eine Säule gepackt.

Durchmesser (Säule)	:	2.5 cm
Höhe (Gelbett)	:	30 cm
Elutionsmittel	:	A. dest.
Elutionsgeschwindigkeit	:	2 ml/min
Fraktionsvolumen	:	2.5 ml

Das Ausschlußvolumen wurde bestimmt durch Chromatographie von 10 ml einer Lösung von 0.1 % (w/v) Dextran-Blau (Pharmacia). Die im Ausschlußvolumen eluierende Probe wurde durch Lyophilisierung isoliert. Eine Charakterisierung des Produkts erfolgte durch Bestimmung des Gehaltes an D-Glucuronsäure (siehe 2.7.1) sowie Messung der $O.D._{530}$ von P_r-HA und P_r-Lösungen bekannter Konzentration. In einem Parallelversuch wurden unter den beschriebenen Bedingungen 100 mg Dextran 60 (Serva) mit Procion-Rot angefärbt.

.4 Gewinnung von [^{3}H-]-Hyaluronat durch Einbau von [^{3}H]-Glucosamin (44)

In-vitro Inkubation von Arteriengewebe

Im Schlachthof wurde die Aorta thoracica von sechs frisch geschlachteten Rindern (1-2 Jahre alt) entnommen und bis zur Inkubation, die etwa 60 min nach Tötung der Tiere erfolgte, in eiskalter 0.155 M NaCl-Lösung aufbewahrt. Die Tunica adventitia und anhaftendes Fettgewebe wurden abpräpariert und die Aortae in ca. 2 cm^2 große Segmente zerschnitten. Je 30 g Aortengewebe wurde mit 80 ml gepufferter Ringer-Lösung versetzt und je 75 µCi [^{3}H]-Glucosamin (D-[6-^{3}H]-Glucosaminhydrochlorid, Amersham Buchler TRK 396, spez. Aktivität: 20 - 40 Ci/mMol) zugegeben. Insgesamt 14 Ansätze (420 g Gewebe) wurden an zwei Warburg-Apparaturen bei 37° C unter Schütteln für 24 h inkubiert und während dieser Zeit mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) begast. Die Inkubation wurde gestoppt durch dreimaliges Waschen des Gewebes mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung.

Proteolytischer Abbau

Das Gewebe wurde mit Papain-Puffer versetzt (5 ml/g Gewebe), nach 0,24 und 48 h jeweils 10.5 g Papain (E.C. Nr. 3.4.22.2, Merck, spez. Aktivität: 12 000 units/g) zugesetzt und für insgesamt 72 h bei 60° C inkubiert. Anschließend wurde das Proteolysat für 72 h gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Nach Dialyse wurde das Proteolysat zentrifugiert (20 min bei 3 000 xg das Sediment in 200 ml A. dest. suspendiert und erneut zentrifugiert (60 min bei 177 700 xg). Der Überstand wurde zur Ionenaustauschchromatographie verwendet.

Ionenaustauschchromatographie an Dowex 1 X 2

400 g Dowex 1 X 2 (Serva) wurden mehrfach mit A. dest. gewaschen in 0.1 M NaCl-Lösung suspendiert und in eine Säule gepackt.

Durchmesser (Säule)	:	2.6 cm
Höhe (Gelbett)	:	75 cm
Elutionsgeschwindigkeit	:	41 ml/h
Fraktionsvolumen	:	10 ml

Die Säule wurde mit 0.1 M NaCl-Lösung äquilibriert. Nach Auftragen des Proteolysats (ca. 225 ml) wurde mit 600 ml 0.1 M NaCl-Lösung gewaschen und anschließend mit 4 l eines linearen NaCl-Gradienten (0.1 - 2 M) eluiert. Es wurden 400 Fraktionen aufgefangen, von denen jeweils 0.1 ml zur Bestimmung des Gehaltes an D-Glucuronsäure und zur Bestimmung der ^{3}H -Radioaktivität entnommen wurden. Von jeder fünften Fraktion wurde die Leitfähigkeit bestimmt.

Ethanol-Fällung und $MgCl_2$-Extraktion

Die bei 0.5 M NaCl-Konzentration eluierten Fraktionen wurden vereinigt (Volumen: 590 ml) und aus einem Tropftrichter unter Rühren das fünffache Volumen von absolutem Ethanol mit 1.2 % (w/v) Kaliumacetat zugesetzt. Die Fällung wurde für 48 h stehengelassen, anschließend zentrifugiert (10 min bei

12 062 xg), die Sedimente mit je 5 ml absolutem Ethanol gewaschen und erneut wie oben zentrifugiert. Die Sedimente wurden in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen (für Rotor 60 Ti) überführt, mit absolutem Ethanol aufgefüllt und zentrifugiert (60 min bei 177 700 xg). Das Sediment wurde mit 5 ml 0.25 M $MgCl_2$-Lösung überschichtet, über Nacht geschüttelt und in der Ultrazentrifuge wie angegeben zentrifugiert. Der Überstand wurde aufgehoben, die Extraktion des Sediments mit 0.25 M $MgCl_2$ wurde dreimal wiederholt. Die vereinigten Überstände (Volumen: 154 ml) wurden wie oben beschrieben mit dem fünffachen Volumen von absolutem Ethanol-1.2 % Kaliumacetat gefällt und zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit absolutem Ethanol, danach zweimal mit Ether gewaschen, in 10 ml A. dest. gelöst, für 72 h gegen 4 x 5 l A. dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Charakterisierung des [^{3}H]-markierten Produkts

Neben den Bestimmungen der [^{3}H]-Radioaktivität und des Gehaltes an D-Glucuronsäure, die nach jedem Schritt der Isolierung durchgeführt wurden, erfolgte eine Untersuchung der Probe auf Verunreinigung mit Glycosaminoglycanen, die ebenfalls wie Hyaluronat D-Glucuronsäure enthalten. Hierzu wurde eine Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 WX 8 zur Trennung von D-Glucosamin und D-Galactosamin nach Gardell (46) durchgeführt.

1 mg [^{3}H]-markierter Probe wurde in 1 ml 8 N HCl gelöst und für 3 h bei 95° C hydrolysiert. Nach Trocknung unter Vacuum wurde die Probe in 0.5 ml 0.3 N HCl gelöst, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge entfernt (2 min bei 15 000 xg) und auf eine Dowex-Säule aufgetragen.

30 g Dowex AG 50 WX 8 (Serva) wurden in 4 N HCl resuspendiert, filtriert, mehrfach mit 0.3 N HCl gewaschen und in eine Chromatographiesäule gefüllt.

Durchmesser (Säule)	:	1 cm
Höhe (Gelbett)	:	35 cm
Elutionsmittel	:	0.3 N HCl
Elutionsgeschwindigkeit	:	11 ml/h
Fraktionsvolumen	:	1 ml

Die Säule wurde mit 0.3 N HCl äquilibriert. Es wurden 200 Fraktionen aufgefangen, von denen jeweils 0.2 ml zur Bestimmung der [^{3}H]-Radioaktivität und 0.5 ml zur Bestimmung des Gehaltes an Hexosamin entnommen wurden. Zur Kontrolle wurde ein Gemisch aus 0.5 g D-Galactosamin (Serva) und 0.5 g D-Glucosamin (Serva) sowie 1 mg Hyaluronat (Serva), das vorher wie oben beschrieben hydrolysiert worden war, unter den angegebenen Bedingungen chromatographiert.

2.6.5 Kovalente Vernetzung von Hyaluronat (87)

Zu einer Lösung von 400 mg Hyaluronat (Serva) in 4 ml 0.2 N NaOH wurden unter Rühren 0.6 ml D,L-1.3-Butadien Epoxid (Aldrich) und 4 mg Natriumborohydrid gegeben. Nach Inkubation im Wasserbad bei 50° C für 2 h wurde mit 1 N Essigsäure neutralisiert, das Gel mit 4 x 10 ml Ether gewaschen und im Exsiccator über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach mechanischem Zerkleinern mit Hilfe einer Präparierschere wurde das Gel in Tris-NaCl-Puffer aufbewahrt.

2.6.6 Kopplung von Hyaluronat-Oligosacchariden an Affi-Gel 701

10 ml Affi-Gel 701 (Bio-Rad) wurden zweimal mit A. dest. und anschließend zweimal mit Phosphat-Puffer (pH = 6.3) gewaschen, indem die Suspension zunächst zentrifugiert wurde (6 000 xg für 10 min), dann in jeweils 10 ml A. dest. bzw. Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Gel in 8.5 ml Phosphat-Puffer resuspendiert, 1 ml einer Lösung von 10 mg Hyaluronat-Oligosacchariden (siehe 2.8.1 - Probe 2) in Phosphat-Puffer zuge-

setzt und für 30 min gerührt. Dann wurde tropfenweise eine Lösung von 50 mg EDAC (1-Ethyl-3[3-dimethylaminopropyl]carbodiimidhydrochlorid, Sigma) in 0.5 ml Phosphat-Puffer zugesetzt und die Suspension über Nacht gerührt. Die Entfernung nicht kovalent gebundener Oligosaccharide erfolgte durch drei aufeinanderfolgende Waschschritte mit 2 x je 40 ml Phosphat-Puffer (pH = 7.2 mit 0.15 M NaCl), Phosphat-Puffer (pH = 7.2 mit 1.4 NaCl) und Phosphat-Puffer (pH = 7.2 mit 0.15 M NaCl). Vor Gebrauch wurde das Gel einmal mit A. dest. und zweimal mit Tris-Puffer (pH = 8) gewaschen. Ein Kontrollgel wurde identisch behandelt, jedoch die Kopplungsreaktion in Abwesenheit von Hyaluronat-Oligosacchariden durchgeführt. Zur Bestimmung der Menge kovalent gebundener Oligosaccharide wurden je 30 mg von beiden Gelen in 1 ml Hyaluronidase-Puffer resuspendiert, mit jeweils 300 NF units Hyaluronidase (Sigma) versetzt und für 20 h bei 37^{0} C inkubiert. Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge (15 000 xg für 5 min) wurden die Überstände auf Gehalt an D-Glucuronsäure getestet.

2.7 Chemisch-analytische Methoden

2.7.1 D-Glucuronsäure (36, 49)

Reagenzien:

- Borat-Lösung : 0.8 M H_3BO_3-Lösung, mit 1 M KOH auf pH = 9 eingestellt
- H_2SO_4-Borat-Lösung : 195 ml H_2SO_4 (conz.), mit 5 ml Borat-Lösung versetzt
- Carbazol-Lösung : 0.1 % (w/w) Carbazol (Fluka) in 95 % Ethanol
- Standard : D-Glucuronsäure (Serva), 50 µg/ml in A. dest.

Test

Zu 0.7 ml Probe werden 6 ml H_2SO_4-Borat-Lösung gegeben, für 15 min auf 100° C erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 0.2 ml Carbazol-Lösung wird erneut für 10 min auf 100° C erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur die O.D. bei 530 mm bestimmt gegen A. dest. als Leerwert. In einigen Fällen wurde der Test mit 0.35 ml oder 0.1 ml Probelösung durchgeführt. Die Volumina der Reagenz-Lösungen wurden entsprechend reduziert.

2.7.2 N-Acetyl-D-Glucosamin (47)

Reagenzien:

- Borat-Lösung pH = 9.2 : 1.12 M Borsäure
  0.56 M KOH in 1 000 ml A. dest
- Essigsäureanhydrid-Lösung : 1.5 % (v/v) Essigsäureanhydrid in Aceton

- DAB-Lösung : 3 g p-Dimethylaminobenzaldehyd (Merck) gelöst in 3.75 ml HCl (conz.) und 26.75 ml Eisessig

  Vor Gebrauch wird das Reagenz mit 9 Volumina Eisessig verdünnt.

- Standard : N-Acetyl-D-Glucosamin (Serva), 100 µg/ml in A. dest.

Test

Ein Gemisch aus 1 ml Probelösung, 0.2 ml Essigsäureanhydrid-Lösung und 1 ml Borat-Lösung wird für 3 min auf 100° C erhitzt, dann für 5 min im Eisbad gekühlt. Nach Hinzufügen von 7.8 ml DAB-Lösung und Erhitzen auf 37° C für 20 min wird die O.D. bei 570 nm bestimmt gegen A. dest. als Leerwert.

7.3 Hexosamine (46)

Reagenzien:

- Acetylaceton-Lösung : 33.3 % (v/v) Acetylaceton (2.4-Pentandion) in 1.25 M Na_2CO_3-Lösung

- DAB-Lösung : 1.6 g p-Dimethylaminobenzaldehyd gelöst in 30 ml HCl und 30 ml Ethanol (absolut)

- Standard : D-Glucosamin (Serva) und D-Galactosamin (Serva) 200 µg/ml in 0.3 N HCl

Test

0.5 ml Probelösung und 1 ml Acetylaceton-Lösung werden vermischt und für 60 min auf 96° C erhitzt. Nach 5 min Abkühlen auf Raumtemperatur werden 10 ml Ethanol und 1 ml DAB-Lösung zugefügt, gründlich durchmischt und für 60 min bei Raumtemperatur belassen. Dann wird die O.D. bei 535 nm bestimmt gegen 0.3 N HCl als Leerwert.

2.7.4 2-Keto-3-desoxyoctonat (76)

Reagenzien:

- Perjodsäure-Lösung : 0.04 M H_5JO_6 in 0.125 N H_2SO_4
- Natriumarsenit-Lösung : 2.6 % (w/v) $NaAsO_2$ in 0.5 N HCl
- Thiobarbitursäure-Lösung : 0.6 % (w/v) Thiobarbitursäure in A. dest.
- Dimethylsulfoxid (Serva)
- Standard : 2-Keto-3-desoxyoctonat (Sigma), 10 µg/ml in 0.2 N H_2SO_4

Test

0.5 ml Probelösung wird für 30 min auf 100° C erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 0.25 ml Perjodsäure-Lösung zugefügt. Nach 20 min Stehen bei Raumtemperatur werden 0.25 ml Natriumarsenit-Lösung zugefügt und gewartet, bis die gelblichbraune Farbe verschwunden ist. Nach Zugabe von 0.5 ml Thiobarbitursäure-Lösung und Erhitzen für 15 min auf 100° C wird zu der heißen Lösung 1 ml Dimethylsulfoxid gegeben, auf Raumtemperatur abgekühlt und die O.D. bei 548 nm bestimmt gegen 0.2 N H_2SO_4 als Leerwert.

Nach Behandlung der Bakterien mit EDTA (Material und Methoden 2.5.4) wurde der Gehalt an KDO bestimmt, indem 0.5 ml Überstand mit 0.5 ml 0.4 N H_2SO_4 vermischt wurden und die Proben für 30 min auf 100° C erhitzt wurden. Nach Abkühlen und Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge (6 min bei 15 000 xg) wurden jeweils 0.5 ml vom Überstand mit Perjodsäure-Lösung versetzt und wie beschrieben weiterbehandelt.

7.5 Protein

mit Coomassie Blue (18)

Reagenzien:

- Farbstoff-Lösung : 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva) gelöst in 50 ml 95 % Ethanol und 100 ml 85 % H_3PO_4

  Die Lösung wird mit A. dest. auf 1 000 ml aufgefüllt und durch einen Faltenfilter filtriert.

- Standard : Rinderserum-Albumin (zweimal kristallisiert, Sigma), 100 µg/ml in 66 mM Tris-Puffer

Test

0.1 ml Probelösung wird mit 1 ml Farbstoff-Lösung gemischt und nach 2 min Stehen bei Raumtemperatur die O.D. bei 595 nm bestimmt gegen 66 mM Tris-Puffer als Leerwert.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der angereicherten Exolipase-Präperation (Material und Methoden 2.5.2) wurde der Coomassie Blue-Test in der Modifikation nach (107) verwendet.

in Gegenwart von Triton X-100 (90)

Reagenzien:

- Soda-Lösung : 2 g Na_2CO_3 in 100 ml 0.1 N NaOH

- Kupfersulfat-Tartrat-Lösung: 0.5 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ in 100 ml 1 % (w/v) Lösung von Di-Natrium-tartrat in A. dest.

- Alkalische Kupfer-Lösung : 50 ml Soda-Lösung und 1 ml Kupfersulfat-Tartrat-Lösung mischen

- Folin-Ciocalteus-Phenol-reagenz (Merck)

- Sonstige Chemikalien : Isoamylalkohol, Chloroform, 1 N NaOH

- Standard : Rinderserum-Albumin (zweimal kristallisiert, Sigma), 100 µg/ml in 50 mM Tris-Puffer, 0.1 M NaCl

Test

0.25 ml Probelösung und 0.25 ml NaOH werden mit 2.5 ml alkalischer Kupferlösung vermischt und 10 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Zufügen von 1.5 ml Isoamylalkohol und gründlicher Durchmischung wird in der Tischzentrifuge zentrifugiert (10 min bei 2 000 xg) und 2 ml der oberen (alkoholischen) Phase abpipettiert. 2 ml der wäßrigen Phase werden in saubere Reagenzgläser überführt, mit 0.19 ml Folin-Reagenz vermischt, 1 ml Chloroform zugefügt und zentrifugiert (15 min bei 2 000 xg). Nach 30 min Stehen bei Raumtemperatur wird die O.D. der wäßrigen Phase bei 750 nm bestimmt gegen 50 mM Tris-Puffer, 0.1 NaCl.

.8 Biochemische und -physikalische Methoden

.8.1 Enzymatischer Partialabbau von Hyaluronat

Hyaluronat wurde in Hy'ase Puffer (pH = 5.3) gelöst (10 mg/ml Endkonzentration) und mit Hyaluronidase (E.C. Nr. 3.2.1.35, Sigma, spez. Aktivität: 10 600 NF units/mg) für die in Tab. 2 angegebenen Zeiten bei 37° C bebrütet.

Proben-Nr.	Hyaluronat (mg)	Hyaluronidase (NF units/mg HA)	Dauer der Enzymeinwirkung (h)	Verwendung des Produkts zur
1	150	2	2	Reduktion
2	100	10	0.5	Kopplung mit P_T und Affi-^{T}Gel
3	100	15	24	Isolierung von Oligosacchariden

Tab. 2: Versuchsbedingungen beim enzymatischen Partialabbau von Hyaluronat

Die Reaktion wurde gestoppt durch Erhitzen der Proben für 10 min im Wasserbad bei 100° C. Nach Zentrifugation für 10 min bei 17 370 xg wurden die Proben 1 und 2 durch Chromatographie über Sephadex G-25 entsalzt. Die im Ausschlußvolumen eluierenden Proben wurden durch Lyophilisierung gewonnen. Der Überstand von Probe 3 wurde direkt zur Molekularsiebchromatographie verwendet.

2.8.2 Molekularsiebchromatographie zur Isolierung von Oligosacchariden

360 ml Ultrogel AcA 202 (LKB) wurden in 240 ml Pyridin-Acetat Puffer suspendiert, entgast und in eine Chromatographiesäule gefüllt.

Durchmesser (Säule)	:	2.5 cm
Höhe (Gelbett)	:	120 cm
Elutionsmittel	:	Pyridin-Acetat-Puffer (pH = 5.0)
Elutionsgeschwindigkeit	:	26 ml/h
Fraktionsvolumen	:	3 ml

Die Säule wurde mit Pyridin-Acetat-Puffer äquilibriert. Das Ausschlußvolumen wurde bestimmt durch Chromatographie einer 0.1 % (w/v)-Lösung von Dextran-Blau (Pharmacia, MW: 2×10^6). Zu 10 ml einer Lösung von Hyaluronidase-behandeltem Hyaluronat (100 mg) (siehe 2.8.1 - Probe 3) wurden 300 µg D-Glucuronsäure als Marke zugefügt und die Lösung auf die Säule aufgetragen. Aus den aufgefangenen 150 Fraktionen wurden jeweils 0.3 ml entnommen und auf Gehalt an D-Glucuronsäure getestet. Die Oligosaccharidhaltigen Fraktionen wurden mittels eines Differentialrefraktometers mit angeschlossenem Kompensationsschreiber bestimmt, vereinigt und lyophilisiert.

Zur Reinigung und endgültigen Identifizierung der isolierten Oligosaccharide wurde diese getrennt über Ultrogel AcA 202 rechromatographiert.

Durchmesser (Säule)	:	1.5 cm
Höhe (Gelbett)	:	75 cm
Elutionsmittel	:	Pyridin-Acetat-Puffer (pH = 5.0)
Elutionsgeschwindigkeit	:	12 ml/h
Fraktionsvolumen	:	1.83 ml

Nach Bestimmung des Ausschlußvolumens mit Dextran-Blau wurden zur Eichung der Säule jeweils 5 mg von Polyethylenglykol (Serva) mit einem mittleren Molekulargewicht von 610, 1 000, 1 450, 3 350 und 6 750 Dalton chromatographiert. Unter den gleichen Chromatographiebedingungen wurden vier Oligosaccharid-Präparate (HA_4, HA_6, HA_8 und HA_{10}) chromatographiert und refraktometrisch bestimmt. Durch Auftragung der Logarithmen der Molekulargewichte gegen die Verteilungskoeffizienten K_{av} der verschiedenen Polyethylenglykol-Präparate wurde eine Eichkurve erhalten, aus der, bei bekanntem K_{av}, die Molekulargewichte für die HA-Oligosaccharid-Präparate ermittelt wurden. Die Verteilungskoeffizienten wurden ermittelt nach:

$$K_{av} = \frac{V_E - V_o}{V_T - V_o}$$

mit

V_E = Elutionsvolumen der Probe
V_o = Elutionsvolumen von Dextran-Blau
V_T = Volumen des Gelbetts

.3 Viskosimetrie zur Molekulargewichtsbestimmung

90 mg Hyaluronat wurden in einem geeichten Meßkolben in 15 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst und durch entsprechende Verdünnung sieben Hyaluronat-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (0.25 - 6 mg/ml) hergestellt. Die Durchlaufzeiten dieser Lösungen wurden bestimmt in einem Kapillar-Viskosimeter nach Ostwald (Fa. Schott):

Durchmesser (Kapillare)	:	0.6 ± 0.01	mm
Länge (Kapillare)	:	100	mm
Durchflußvolumen	:	0.5	ml
Druckhöhe	:	110	mm
Füllmenge	:	3	ml

Das Viskosimeter war eingehängt in ein Temperiergefäß, das durchflossen wurde von auf 20 ± 0.2° C temperiertem Wasser. Nach Einfüllen der jeweiligen Probe wurde diese für 30 min im Viskosimeter temperiert, danach wurde in drei aufeinanderfolgenden Messungen die Durchlaufzeit bestimmt. Zur Berechnung wurde der Mittelwert aus den gemessenen Durchlaufzeiten verwendet. Die sogenannte 'limiting viscosity number' $[\eta]$ ist nach (121) gegeben durch:

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \left(\frac{1}{c} \ln \frac{\eta}{\eta_o} \right)$$

mit:
- c = Konzentration des gelösten Stoffes (gml^{-1})
- η = Viskosität der Probenlösung (Poise)
- η_o = Viskosität des Lösungsmittels (Poise)

Durch Auftragung von $\frac{1}{c} \ln \frac{\eta}{\eta_o}$ gegen c und Extrapolation gegen $c = 0$ wurde $[\eta]$ ermittelt. Hieraus ergibt sich nach (7) das Molekulargewicht von Hyaluronat:

$$[\eta] = 0.029 \; M_W^{0.80}$$

2.8.4 Affinitätschromatographie an Hyaluronat-Gelen

6 ml einer Suspension des durch kovalente Vernetzung gewonnenen Hyaluronat-Gels in Tris-NaCl-Puffer wurden in eine Chromatographiesäule gefüllt.

Durchmesser (Säule)	:	1 cm
Höhe (Gelbett)	:	8 cm
Elutionsmittel	:	Tris-NaCl-Puffer
Elutionsgeschwindigkeit	:	5 ml/h
Fraktionsvolumen	:	1 ml

Die Säule wurde mit Tris-NaCl-Puffer äquilibriert. Es wurden 0.5 ml (= 3 x 10^4 EU) vorgereinigter Exolipaselösung aufgetragen und mit 20 ml Tris-NaCl-Puffer gewaschen. Dann wurde mit Tris-NaCl-Puffer eluiert, der 2 % (v/v) Triton X-100 enthielt. Von den aufgefangenen Fraktionen wurden jeweils 0.25 ml zur Bestimmung des Proteingehalts und 0.1 ml zur Bestimmung der Exolipaseaktivität entnommen.

Je 4 x 0.5 g Feuchtgewicht von Hyaluronat-gekoppeltem Affi-Gel sowie Kontrollgel wurden in je 1 ml Tris-Puffer (pH = 8.0) suspendiert, in dem verschiedene Konzentrationen vorgereinigter Exolipase gelöst waren (0.5 - 2 x 10^3 EU). Die Suspensionen wurden für 60 min bei 30° C unter Schütteln inkubiert, zentrifugiert (12 000 xg für 10 min), je 0.5 ml Überstand entnommen und die Exolipaseaktivität bestimmt.

2.9 Enzym-Tests

2.9.1 Exolipase (137)

Substratemulsion:

Zu einer Lösung von 207 mg Natriumdesoxycholat und 100 mg Gummi arabicum in 90 ml 50 mM Phosphat-Puffer wird unter Rühren eine Lösung von 30 mg p-Nitrophenylpalmitat (Serva) in 10 ml Isopropanol gegeben. Die Emulsion wird innerhalb einer Stunde nach Herstellung verbraucht.

Test

2.4 ml Substratemulsion werden 5 min bei 37° C temperiert, 0.1 ml Überstand zugesetzt, gemischt und für genau 15 min bei 37° C inkubiert. Dann wird die O.D. bei 410 nm bestimmt gegen 66 mM Tris-Puffer als Leerwert.

Eine Enzymeinheit (1 EU) extrazellulärer Lipase setzt unter den beschriebenen Testbedingungen 1 nmol p-Nitrophenol ml^{-1} min^{-1} frei. Eine $O.D._{410}$ = 1.0 entspricht dabei einer Enzymaktivität von 96.72 nmol ml^{-1} min^{-1}. Die Exolipaseaktivität im Überstand bei Kurzzeitversuchen ist, wenn nicht anders erwähnt, jeweils bezogen auf eine Zelldichte von 1×10^9 Bakterien.

2.9.2 Hyaluronidase

Mit drei Methoden wurde untersucht, ob *Pseudomonas aeruginosa* zellfreie oder zellgebundene Hyaluronidase synthetisiert.

- mit einer Plattierungsmethode in Gegenwart von Hyaluronat und Rinderserumalbumin mit Präzipitierung des nicht degradierten Substrates durch Essigsäure (zur Identifizierung Hyaluronidase-produzierender Mikroorganismen (122)

- mit einer Plattierungsmethode auf Agarose-Gel in Gegenwart von Hyaluronat mit Präzipitierung des nicht degradierten Substrates mit Cetylpyridiniumchlorid (Nachweisgrenze 3×10^{-4} NF units) (108)

- mit einer spektrophotometrischen Methode durch Kopplung eines Carbocyanin-Farbstoffes an nicht degradiertes Substrat (Nachweisgrenze 5×10^{-5} NF units) (9)

3. ERGEBNISSE

3.1 Wirkung von Hyaluronat auf die Exolipaseaktivität

3.1.1 Natives Hyaluronat

Mit Hilfe viskosimetrischer Daten erfolgte eine Abschätzung des Molekulargewichtes des verwendeten nativen Hyaluronat-Präparates.

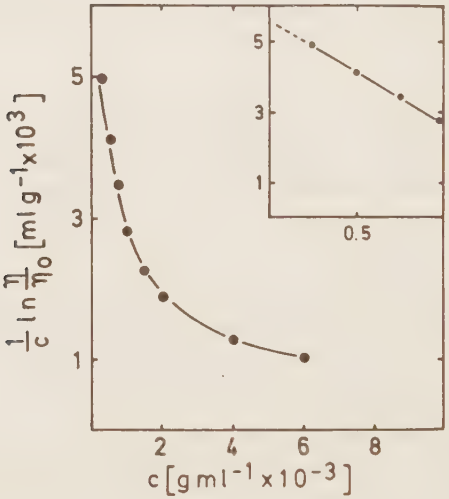

Abb. 3: Ermittlung der 'limiting viscosity number' $[\eta]$ durch Auftragung der spezifischen Viskosität gegen die Konzentration verschiedener Lösungen von Hyaluronat in A. dest.
Einschub-Diagramm: Extrapolation des linearen Teils des Graphen gegen c = 0. Die Koordinaten sind in beiden Darstellungen identisch.

Aus Abb. 3 (Einschub-Diagramm) ergibt sich für die 'limiting viscosity number':

$$[\eta] = 5\ 600\ \text{ml g}^{-1}$$

Daraus folgt für das Molekulargewicht von nativem Hyaluronat:

$$MW = 4.0 \times 10^6$$

Bei Bebrütung einer Suspension von Pseudomonas aeruginosa in Tris-Puffer unter Bedingungen eines Kurzzeitversuchs betrug die im Überstand meßbare Aktivität extrazellulärer Lipase je nach Dauer der Bebrütung zwischen 50 und 100 EU/10^9 Bakterien. Die Exolipaseaktivität während eines Kurzzeitversuchs in Anwesenheit von nativem Hyaluronat zeigt Abb. 4.

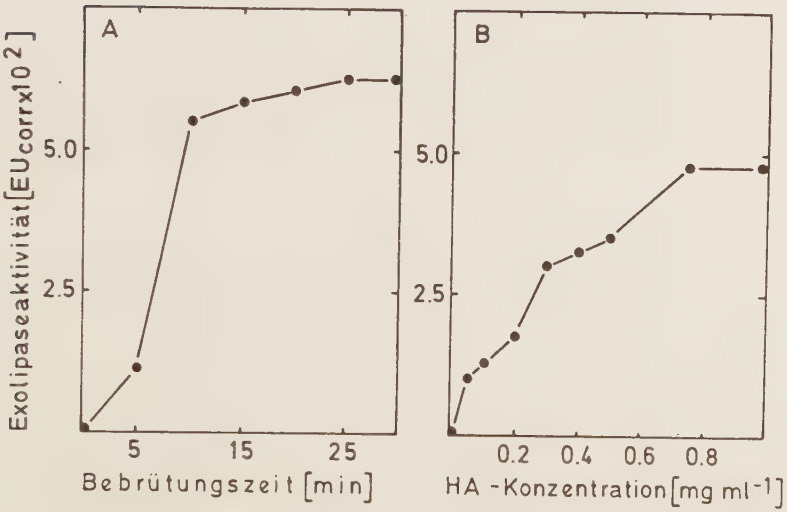

Abb. 4: Exolipaseaktivität im Kurzzeitversuch mit Pseudomonas aeruginosa

A: in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit bei Anwesenheit von Hyaluronat (1 mg/ml Endkonzentration

B: in Abhängigkeit von der Hyaluronat-Konzentration bei einer Bebrütungszeit von 30 min

EU_{corr} = EU (in Anwesenheit von Hyaluronat)-EU (in Abwesenheit von Hyaluronat)

Aus Abb. 4 ist ersichtlich, daß die Exolipaseaktivität im Verlaufe eines Kurzzeitversuchs nach 20 - 30 min Bebrütung und bei einer Konzentration von etwa 1 mg/ml Hyaluronat ihren maximalen Wert erreichte. Bezieht man die Exolipaseaktivität in Anwesenheit von Hyaluronat auf die spontane, d.h. in dessen Abwesenheit meßbare Aktivität, so ergibt sich, unter Berücksichtigung der Streuung der Werte bei verschiedenen Experimenten, ein Stimulationsfektor ≥ 10.

3.1.2 Oligosaccharide

3.1.2.1 Isolierung und Identifizierung

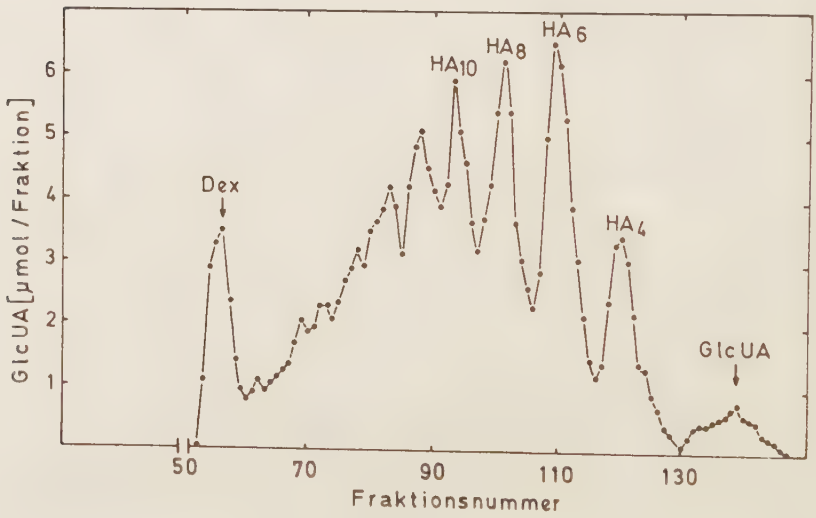

Abb. 5: Molekularsiebchromatographie enzymatisch abgebauten Hyaluronats an Ultrogel AcA 202.

Als Elutionsmittel diente Pyridin-Acetat-Puffer (pH = 5.0). Die Pfeile markieren die in einem getrennten Versuch ermittelten Elutionspositionen von Dextran-Blau (Dex) und D-Glucuronsäure (GlcUA).

Enzymatischer Abbau von Hyaluronat mit testes-Hyaluronidase, einer endo-β-N-Acetylglucosaminidase, liefert eine homologe Reihe von Oligosacchariden, die geradzahlige Vielfache der Hyaluronat-Disaccharideinheit (β-D-GlcUA-(1-3)-β-D-GlcNAc) darstellen. Die Trennung der verschiedenen Oligosaccharide kann durch Molekularsiebchromatographie erfolgen. Abb. 5 zeigt das Elutionsdiagramm enzymatisch abgebauten Hyaluronats (siehe 2.7.1 - Probe 3) nach Chromatographie an Ultrogel AcA 202. Aufgrund der Elutionsposition des zugefügten Markers GlcUA erfolgte nach (56) eine Identifizierung der einzelnen Oligosaccharid-Fraktionen. Durch Vereinigung der Peak-Fraktionen und Lyophilisierung wurden vier Oligosaccharid-Präparate bestehend aus zwei (HA_4) bis fünf (HA_{10}) Disaccharideinheiten gewonnen. Zur weiteren Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung wurden die Oligosaccharid-Präparate getrennt rechromatographiert.

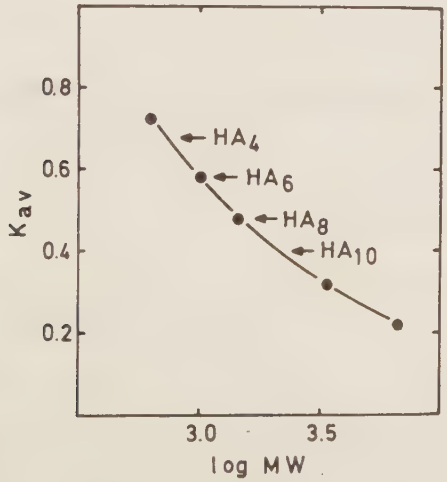

Abb. 6: Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem Verteilungskoeffizienten (K_{av}) verschiedener Polyethylenglykol-Präparate bekannten mittleren Molekulargewichts bei Chromatographie über Ultrogel AcA 202. Die Pfeile zeigen die für die Hyaluronat-Oligosaccharid-Präparate ermittelten Verteilungskoeffizienten.

Mit Hilfe der aus Abb. 6 ersichtlichen Verteilungskoeffizienten (K_{av}) konnten nach Eichung mit Polyethylenglykol die Molekulargewichte ermittelt werden. Der Vergleich der ermittelten mit den berechneten Molekulargewichten (Tab. 3) zeigt im Rahmen der zu erwartenden Genauigkeit Übereinstimmung, so daß die aufgrund des Elutionsprofils (Abb. 5) erfolgte Identifizierung der Oligosaccharid-Fraktionen bestätigt wurde.

Oligosaccharid	K_{av}	MW (berechnet)[1.]	MW (ermittelt)[2.]
HA_4	0.68	758	708
HA_6	0.58	1 137	1 000
HA_8	0.48	1 516	1 469
HA_{10}	0.40	1 895	1 995

Tab. 3: Molekulargewichte der isolierten Hyaluronat-Oligosaccharide
1. berechnet basierend auf einem Molekulargewicht von 379 für eine Disaccharideinheit (79)
2. ermittelt aus Abb. 6

3.1.2.2 Physiologische Wirkung

Die physiologische Wirkung der isolierten Oligosaccharide auf die Exolipaseaktivität von Pseudomonas aeruginosa wurde untersucht, indem die Bakterien im Kurzzeitversuch für 30 min in Anwesenheit der Oligosaccharide (1 mM Endkonzentration) bebrütet wurden. Abb. 7 zeigt, daß alle untersuchten Oligosaccharide eine Stimulation der Exolipaseaktivität bewirkten. Eine deutliche Zunahme des Stimulationsfaktors war bei Verwendung der Oligosaccharid-Fraktion HA_8 (bestehend aus vier Disaccharideinheiten) festzustellen. Die Fraktion $>HA_{10}$ (bestehend aus einem Gemisch von Oligosacchariden aus sechs bis zwölf Disaccharideinheiten) bewirkte eine Stimulation der Exolipaseaktivität, die in der Größenordnung der durch natives Hyaluronat zu erzielenden lag.

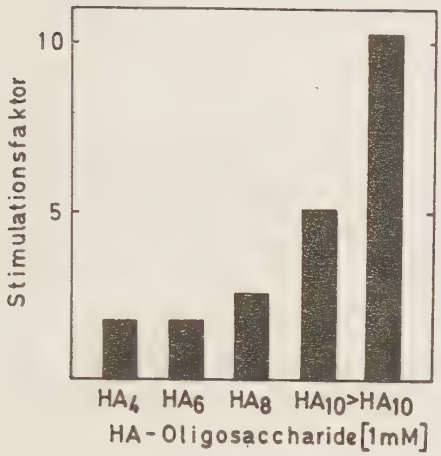

Abb. 7: Stimulation der Exolipaseaktivität durch Hyaluronat-Oligosaccharide im Kurzzeitversuch mit Pseudomonas aeruginosa

Ein Stimulationsfaktor = 1 entspricht der spontanen, d.h. in Abwesenheit von Oligosacchariden meßbaren Exolipaseaktivität (hier 50 EU/10^9 Bakterien)

3.1.3 Methylverestertes Hyaluronat

3.1.3.1 Charakterisierung des Produkts

Methylveresterung von Hyaluronat mit Diazomethan führt zur Bildung der Carboxyl-Methylester der Glucuronsäure-Einheiten des Polysaccharids. Die Existenz zusätzlicher Methylgruppen nach Reaktion mit Diazomethan konnte bereits in früheren Untersuchungen mit Hilfe von ^{13}C-NMR-Spektroskopie gezeigt werden (68). Die prozentuale Gewichtszunahme nach erfolgter Reaktion durch eine zusätzliche Methylgruppe wurde mit gravimetrischer C-H-Analyse von unbehandeltem und methylverestertem Hyaluronat untersucht.

	Zunahme (Gewichts-%)	
	C	H
erwartet[1.]	3.17	0.53
gefunden[2.]	3.79	0.56

Tab. 4: Prozentuale Gewichtszunahme an C und H nach Methylveresterung von Hyaluronat mit Diazomethan

1. berechnet basierend auf einem Molekulargewicht von 379 für eine Disaccharideinheit (79)
2. ermittelt durch gravimetrische C-H-Analyse

Aus Tab. 4 ist zu entnehmen, daß durch Reaktion mit Diazomethan die Carboxylgruppen der Glucuronsäure-Einheiten von Hyaluronat quantitativ in die entsprechenden Carboxyl-Methylester überführt wurden.

3.1.3.2 Physiologische Wirkung

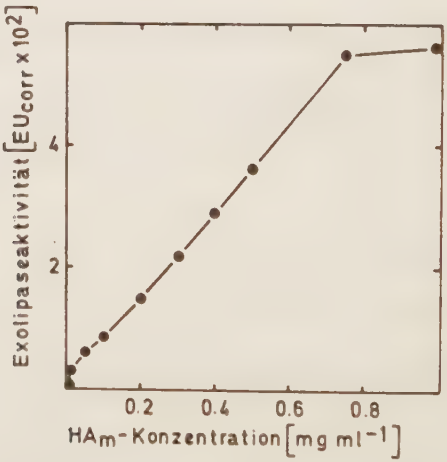

Abb. 8: Exolipaseaktivität im Kurzzeitversuch mit Pseudomonas aeruginosa in Abhängigkeit von der Konzentration an methylverestertem Hyaluronat (HA_m) bei einer Bebrütungszeit von 30 min
EU_{corr} = EU (in Anwesenheit von HA_m)-EU (in Abwesenheit von HA_m)

Pseudomonas aeruginosa wurde im Kurzzeitversuch für 30 min in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an methylverestertem Hyaluronat bebrütet. Methylverestertes Hyaluronat war wie das native Polysaccharid in der Lage, die Exolipaseaktivität im Kurzzeitversuch mit Pseudomonas aeruginosa zu stimulieren, wobei im Bereich von 0.1 - 0.5 mg HA_m/ml eine lineare Abhängigkeit der im Überstand meßbaren Exolipaseaktivität von der Konzentration festgestellt wurde. Die nach 30 min Bebrütung mit einer Konzentration von 1 mg HA_m/ml erreichte maximale Enzymaktivität lag um 10-15 % höher als die in Anwesenheit von nativem Hyaluronat meßbare (Mittelwerte aus vier Parallelversuchen, siehe auch Abb. 4-B). Bei Bebrütung von Pseudomonas aeruginosa in Anwesenheit von HA_m (1 mg/ml Endkonzentration) und Messung der Exolipaseaktivität in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit ergab sich eine Beziehung, die der in Abb. 4-A für natives Hyaluronat dargestellten analog war. Durch quantitative Methylveresterung wurde die physiologische Wirksamkeit von Hyaluronat im Sinne einer Stimulation der Exolipaseaktivität verbessert.

3.1.4 Reduziertes Hyaluronat

3.1.4.1 Charakterisierung des Produkts

Durch kontrollierten enzymatischen Abbau von Hyaluronat mit testes-Hyaluronidase (siehe 2.8.1 - Probe 1) wurde ein Präparat gewonnen, dessen Molekulargewicht mit Hilfe viskosimetrischer Messungen (siehe 2.8.3) mit 7.7×10^4 bestimmt wurde. Bedingt durch die Wirkungsweise von testes-Hyaluronidase als endo-β-N-Acetylglucosaminidase erhöhte sich im enzymbehandelten Präparat die Zahl der reduzierenden terminalen N-Acetyl-Glucosamin-Reste etwa 15-fach gegenüber unbehandeltem Hyaluronat (Tab. 5 - Probe 2). Durch Behandlung mit Natriumborohydrid wurden die terminalen Reste, unter Berücksichtigung der Genauigkeit des verwendeten Tests (siehe 2.7.2), quantitativ zu den entsprechenden N-Acetyl-Glucosaminitolen reduziert (Tab. 5 - Probe 3). Erneute Behandlung des reduzierten Produkts mit testes-Hyaluronidase führte zu der oben beschriebenen Zunahme der Anzahl reduzierender Reste.

3.1.4.2 Physiologische Wirkung

Proben-Nr.	Vorbehandlung von HA mit	Gehalt an reduzierenden GlcNAc-Resten[1.] (Gewichts-%)	relative Exolipaseaktivität[2.] (%)
1	-	0.1	100
2	Hy'ase	1.5	68.5
3	Hy'ase + $NaBH_4$	0.2	52.2
4	Hy'ase + $NaBH_4$ + Hy'ase	1.6	71.0

Tab. 5: Physiologische Wirkung von enzymatisch abgebautem und reduziertem Hyaluronat auf die Exolipaseaktivität im Kurzzeitversuch mit Pseudomonas aeruginose

1. bestimmt mit dem Test nach (47) (siehe 2.7.2)

2. die Exolipaseaktivitäten wurden gemessen im Kurzzeitversuch nach 30 min Bebrütung mit den Proben 1-4 (1 mg/ml Endkonzentration). 100 % entspricht einer Enzymaktivität von 525 $EU_{corr}/10^9$ Bakterien.

Die Exolipaseaktivität im Überstand nach einem Kurzzeitversuch mit Pseudomonas aeruginose in Anwesenheit von Hyaluronat ist ein meßbarer Parameter für die biologische Aktivität des Polysaccharids, d.h. dessen Fähigkeit, die Exolipaseaktivität zu erhöhen. Aus Tab. 5 ist ersichtlich, daß kurzzeitige Behandlung von Hyaluronat mit testes-Hyaluronidase dessen biologische Aktivität um ca. 30 % erniedrigte. Bei weiterem enzymatischen Abbau (bis zu einem Molekulargewicht von ca. 5 000) blieb die biologische Aktivität konstant (Ergebnisse nicht dargestellt, siehe auch Abb. 7). Reduktion der terminalen N-Acetyl-Glucosamin-Reste führte zu einem weiteren Rückgang der biologischen Aktivität des Polysaccharids um ca. 20 %. Dieser Vorgang war reversibel; nach Schaffung neuer reduzierender Reste stieg die biologische Aktivität wieder auf den vor der Reduktion erreichten Wert an.

3.2 Interaktion von Hyaluronat mit Pseudomonas aeruginosa

3.2.1 Wirkung von nativem Hyaluronat auf EDTA-vorbehandelte Zellen

Um zu untersuchen, ob die physiologische Wirkung von Hyaluronat eine Interaktion mit der äußeren Membran von Pseudomonas aeruginosa voraussetzt, wurden Bakterien mit sowohl chemisch wie strukturell veränderter äußerer Membran auf ihr Verhalten bei Bebrütung im Kurzzeitversuch mit Hyaluronat getestet. Zu chemischen und strukturellen Änderungen der äußeren Membran führt die Behandlung von Pseudomonas aeruginosa mit EDTA (48, 109, 135). In Vorversuchen wurde festgestellt, daß EDTA-Behandlung (Konzentrationsbereich 0.1 - 0.5 mM)

- von zellfreier Exolipase deren Enzymaktivität nicht beeinflußt;
- von Hyaluronat dessen biologische Aktivität nicht beeinflußt;
- von Bakterien nicht mit steigender EDTA-Konzentration zunehmende Mengen an Exolipase freisetzt.

EDTA-Behandlung von Pseudomonas aeruginosa führte zu einer Freisetzung von Lipopolysaccharid (gemessen als KDO) und Protein. Die maximal freisetzbare Menge dieser Membranbestandteile wurde bei einer Konzentration von größer gleich 0.2 mM EDTA und höher erreicht (Abb. 9-A). Bei diesen hohen EDTA-Konzentrationen sank auch das Überleben der Zellen auf 1 - 5 % (Abb. 9-B) und Hyaluronat wurde physiologisch unwirksam. Bei Behandlung mit 0.1 mM EDTA überlebten jedoch etwa 80 % der Zellen. Parallel mit der sehr effektiven Freisetzung von LPS und Protein nahm der Einbau von [^{14}C]-Prolin um ca. 45 % ab. Die biologische Aktivität von Hyaluronat gegenüber derart vorbehandelten Bakterien lag bei nur 15 % vom Kontrollwert.

Tab. 6 zeigt, daß der durch EDTA-Behandlung bewirkte membranschädigende Prozeß und der damit einhergehende Verlust der biologischen Aktivität von Hyaluronat zumindest teilweise reversibel war.

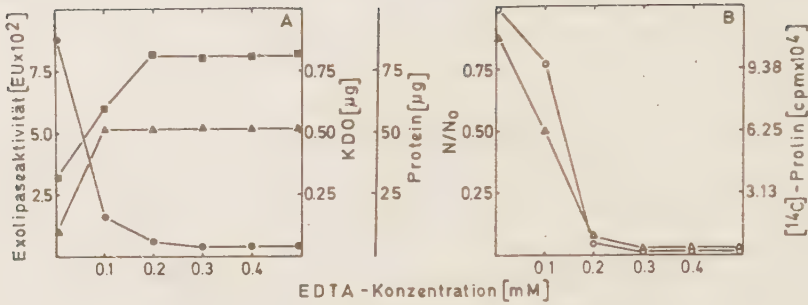

Abb. 9: EDTA-Behandlung von Pseudomonas aeruginosa

Nach Bebrütung der Bakterien mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen wurden gemessen:

A: ● Exolipaseaktivität
▲ KDO-Gehalt
■ Protein-Gehalt

in den Überständen nach Kurzzeitversuchen (30 min) in Anwesenheit von Hyaluronat (1 mg/ml Endkonzentration)

B: ○ Überlebenshäufigkeit (mit $N_o = 4 \times 10^8$ Zellen)
△ Einbau von [^{14}C]-Prolin in TCA-fällbares Material (nach 30 min Bebrütung mit [^{14}C]-Prolin)

Alle Angaben sind bezogen auf 1 ml EDTA-behandelte oder unbehandelte Zellsuspension.

Proben-Nr.	Vorbehandlung der Bakterien mit	Exolipaseaktivität (EU x 10^2)
1	-	8.8
2	Mg^{++} (1 mM)	8.5
3	EDTA (0.2 mM)	0.6
4	EDTA (0.2 mM), danach Mg^{++} (1 mM)	2.6

Tab. 6: Physiologische Wirkung von Hyaluronat (1 mg/ml Endkonzentration) im Kurzzeitversuch (30 min) auf EDTA- und/oder Mg^{++}-vorbehandelte Zellen von Pseudomonas aeruginosa (näheres siehe Text)

Wurden die Bakterien unmittelbar nach Behandlung mit 0.2 mM EDTA mit einem fünffachen Überschuß an Mg^{++}-Ionen versetzt, so schien, wie in der Literatur beschrieben (5, 124), eine partielle "Reparatur" der entstandenen Schäden stattzufinden. Die biologische Aktivität von Hyaluronat, die nach EDTA-Behandlung nur noch etwa 8 % betrug, stieg wieder auf ca. 30 % des Ausgangswertes.

2.2 Wirkung von nativem Hyaluronat auf phagenresistente Mutanten

Als Rezeptoren für Pseudomonas aeruginosa-Phagen wurden neben Exopolysaccharid-Komponenten und Pili vor allem LPS und Protein als Bestandteile der äußeren Membran der Wirtszellen beschrieben (82, 99). Protein-Rezeptoren haben nicht selten zusätzliche Funktionen bei der Stoffaufnahme durch Bakterien (19, 41). Phagenresistenz kann auf dem Fehlen oder der mutativen Veränderung der zur Adsorption notwendigen Rezeptoren der Wirtszellen beruhen. Damit stellt die Isolierung von phagenresistenten Mutanten eine Möglichkeit zur Gewinnung von Bakterien mit veränderter äußerer Membran dar.

Es wurden jeweils 20 unabhängige Resistenzmutanten gegen die verwendeten Phagen (siehe 2.1) isoliert und davon jeweils fünf zusammen mit den entsprechenden Wildtyp-Klonen im Kurzzeitversuch in An- und Abwesenheit von Hyaluronat untersucht. Tab. 7 zeigt die spontanen und die in Anwesenheit von Hyaluronat gemessenen Exolipaseaktivitäten von fünf gegen verschiedene Phagen resistenten Mutanten, die sich signifikant von den mit den entsprechenden Wildtyp-Klonen gemessenen Aktivitäten unterschieden. In Vorversuchen erwiesen sich diese Mutanten als adsorptionsresistent. Alle Mutanten zeigten eine gegenüber den Wildtyp-Klonen erhöhte spontane Exolipaseaktivität (die relativen spontanen Exolipaseaktivitäten in Tab. 7 sind größer als 1). In Anwesenheit von Hyaluronat lagen die Stimulationsfaktoren (siehe 3.1.1) zwischen 5.4 und 15.8 für die Wildtyp-Klone und nur zwischen 1.0 und 2.6 für die Mutanten. Die höchste spontane Exolipaseaktivität zeigten

Phage	Rezeptor[1.]	Klon-Nummer Wildtyp	Mutante	spontane Exolipaseaktivität absolut (EU)[2.]	relativ[3.]	HA-stimulierte Exolipaseaktivität absolut (EU)[4.]	relativ[5.]
		5		135	3.0	725	0.7
7	Protein		152	415		483	
		17		54	5.0	700	1.0
21	Protein		66	275		725	
		21		34	18.0	538	1.4
109	LPS		119	613		725	
		40		85	8.0	688	1.0
2	Protein oder LPS		22	688		675	
		50		52	8.0	650	1.2
854	Protein oder LPS		2	413		750	

Tab. 7: Exolipaseaktivitäten in Kurzzeitversuchen mit Wildtyp-Stämmen und phagenresistenten Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa*

1. Literaturangaben (99)
2. berechnet pro 10^9 Bakterien nach Kurzzeitversuch (30 min) in Abwesenheit von Hyaluronat
3. berechnet als Quotient aus den spontanen Exolipaseaktivitäten der Mutanten- und der Wildtyp-Klone
4. berechnet pro 10^9 Bakterien nach Kurzzeitversuch (30 min) in Anwesenheit von Hyaluronat (1 mg/ml Endkonzentration)
5. berechnet als Quotient aus den in Anwesenheit von Hyaluronat gemessenen Exolipaseaktivitäten der Mutanten- und der Wildtyp-Klone

Alle Enzymaktivitäten sind Mittelwerte aus zwei getrennt durchgeführten Versuchen.

die Mutanten-Klone Nr. 119 und 22, die gegen Phagen isoliert wurden, die als Rezeptoren vermutlich LPS benötigen (82, 99). Die Exolipaseaktivität dieser Mutanten läßt sich durch Hyaluronat im Kurzzeitversuch nur geringfügig (Stimulationsfaktor 1.2 für Klon Nr. 119) oder gar nicht (Stimulationsfaktor 1.0 für Klon Nr. 22) stimulieren.

.2.3 Bindung markierter Hyaluronat-Derivate an die Bakterien

.2.3.1 Herstellung und Charakterisierung von Procion-Rot-Hyaluronat

Nach Kopplung von Procion-Rot mit Hyaluronat und Dialyse des Reaktionsansatzes wurde das Procion-Rot-markierte Hyaluronat (P_r-HA) durch Gelchromatographie über Sephadex G-25 isoliert (siehe 2.6.3). Der nicht an Hyaluronat gebundene Farbstoff (MW: 717.0) eluierte als scharfe Bande, die deutlich von dem im Ausschlußvolumen eluierenden Produkt getrennt war. Das Produkt wurde durch Lyophilisierung gewonnen; die Ausbeute betrug 80 %.

Probe	Gehalt an GlcUA[1.] (Gewichts-%)	$\varepsilon_{m\ 530}$[2.] (10^3 x Mol^{-1} cm^{-1})	HA_2/P_r[3.]
P_r-HA	48	9.42	160

Tab. 8: Charakterisierung von Procion-Rot-Hyaluronat

1. bestimmt mit dem Test nach (36, 49) (siehe 2.7.1)

2. molarer Extinktionskoeffizient bei λ_{max} = 530 nm; die Berechnung basiert auf einem Molekulargewicht von 5 x 10^4 für das zur Kopplung verwendete Hyaluronat

3. Hyaluronat-Disaccharideinheiten pro gebundenem Procion-Rot-Molekül; die Berechnung basiert auf einem molaren Extinktionskoeffizienten von 1.17 x 10^4 (Mol^{-1} cm^{-1}) für Procion-Rot

Tab. 8 zeigt, daß das isolierte Produkt mit ca. 50 % den im Rahmen der Meßgenauigkeit zu erwartenden Gehalt an D-Glucuronsäure aufwies und damit als rein anzusehen war. Durch Messung der O.D. von P_r- und P_r-HA-Lösungen bekannter Konzentration bei λ_{max} = 530 nm wurden die molaren Extinktionskoeffizienten ermittelt, deren Kenntnis eine Abschätzung der Effektivität der Kopplungsreaktion erlaubte. Wie aus Tab. 8 hervorgeht, wurde ein Molekül Procion-Rot pro 160 Disaccharideinheiten des verwendeten Hyaluronats gebunden. Kurzzeitversuche mit dem isolierten Produkt zeigten, daß dessen biologische Aktivität um etwa 10 - 15 % geringer war als die von nativem Hyaluronat.

3.2.3.2 Bindeversuche mit Procion-Rot-Hyaluronat

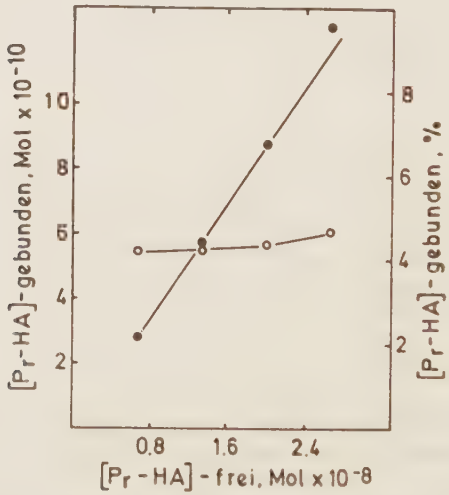

Abb. 10: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von P_r-HA an Pseudomonas aeruginosa

- ● Beziehung zwischen den Konzentrationen an eingesetztem (freiem) und gebundenem P_r-HA
- O Beziehung zwischen den Konzentrationen an eingesetztem P_r-HA und dem prozentual gebundenen Anteil

Die Berechnung der molaren Konzentrationen basiert auf einem Molekulargewicht von 5×10^4 für P_r-HA (siehe 3.2.3.1). Alle Angaben sind bezogen auf eine Zellzahl von 1×10^9 Bakterien.

Mit Hilfe der Zentrifugationsmethode (siehe 2.5.6) wurde gezeigt, daß P_r-HA an Pseudomonas aeruginosa bindet. Die in Anwesenheit steigender Konzentrationen von P_r-HA bebrüteten Bakterien wurden nach Zentrifugation in Phosphat-Puffer resuspendiert und die relative Fluoreszenz der Resuspendate bestimmt gegen ein Resuspendat von Bakterien, die in Abwesenheit von P_r-HA bebrütet worden waren. Wegen der hohen Eigenfluoreszenz der Bakteriensuspensionen sind die mit Hilfe von Standardkurven ermittelten Konzentrationen von gebundenem P_r-HA als Schätzwerte zu betrachten. Abb. 10 zeigt, daß die Menge an gebundenem P_r-HA linear von der Menge an eingesetztem P_r-HA (0.3 - 1.3 mg/10^9 Bakterien) abhängt. Die prozentual gebundene Menge nimmt mit zunehmender Konzentration ebenfalls, jedoch geringfügig, zu.

Dextran gehört zu den Polysacchariden, die im Kurzzeitversuch mit Pseudomonas aeruginosa physiologisch unwirksam sind (113). In Parallelversuchen mit Procion-Rot markiertem Dextran wurde keine Bindung an die Bakterien festgestellt (Ergebnis nicht dargestellt). Dieser Befund spricht dafür, daß in Procion-Rot-markiertem Hyaluronat nicht die chromophore Gruppe sondern der Polysaccharid-Anteil des Moleküls für die Bindung verantwortlich ist.

.2.3.3 Herstellung und Charakterisierung von [^{3}H]-Hyaluronat

Nach in-vitro-Inkubation von arteriellem Gewebe in Gegenwart von [^{3}H]-Glucosamin und anschließendem proteolytischen Abbau wurde Hyaluronat von den ebenfalls im Gewebe vorkommenden sulfatierten Glycosaminoglycanen (Chondroitinsulfat, Heparin, Dermatansulfat) abgetrennt. Abb. 11 zeigt einen Ausschnitt aus dem nach Ionenaustauschchromatographie an Dowex 1 X 2 erhaltenen Elutionsdiagramm. Im Bereich einer NaCl-Konzentration von 0.5 M erreichten der Gehalt der Fraktionen an Glucuronsäure und gleichzeitig die [^{3}H]-Radioaktivität ein Maximum. Nach (44) handelt es sich um die Fraktionen, die [^{3}H]-Hyaluronat enthalten. Nach Vereinigung

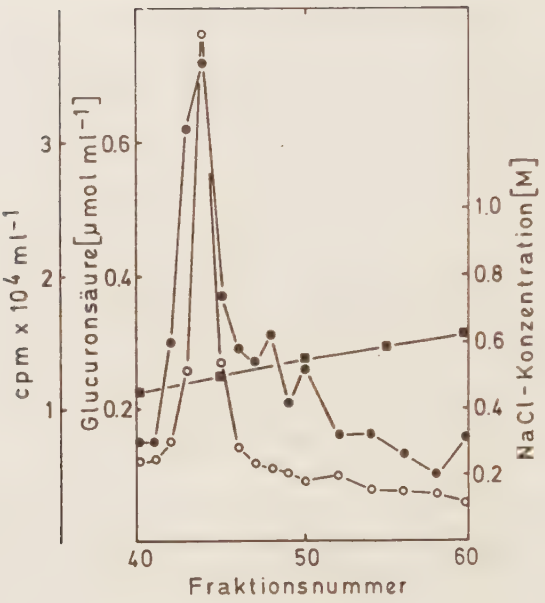

Abb. 11: Ionenaustauschchromatographie eines Proteolysats von arteriellem Gewebe an Dowex 1 X 2 (siehe 2.6.4) (Ausschnitt aus dem Elutionsdiagramm)

In den Fraktionen wurde bestimmt:

- ● Glucuronsäure-Gehalt mit dem Test nach (36, 49)
- ○ [^{3}H]-Radioaktivität
- ■ NaCl-Konzentration (gemessen wurde die Leitfähigkeit)

der Fraktionen Nr. 40 bis 55 (Abb. 11) und weiterer Aufarbeitung (siehe 2.6.4) wurden 93 mg [^{3}H]-markiertes Material mit einer spezifischen Aktivität von 2 x 10^4 cpm/mg erhalten. Der Gehalt an D-Glucuronsäure betrug 0.75 µmol/mg. Bei einem theoretischen Glucuronsäure-Gehalt von 2.6 µmol/mg für natives Hyaluronat ergab sich, daß ca. 70 % des isolierten Materials keine Glucuronsäure-Bestandteile enthielten.

Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, dem Hyaluronat nahe verwandte Glycosaminoglycane, enthalten ebenfalls D-Glucuronsäure, als andere Komponente jedoch N-Acetyl-Galactosamin. Um festzustellen, ob der nachgewiesene Gehalt der Probe an D-Glucuronsäure vom Hyaluronat stammte, wurde das markierte Produkt auf Gehalt an D-Glucosamin bzw. D-Galactosamin untersucht. Nach Chromatographie eines Gemisches aus D-Glucosamin und D-Galactosamin ergaben sich zwei deutlich getrennte Peaks, die nach (46) identifiziert wurden. Die Maxima des nach Chromatographie des Hyaluronats erhaltenen Peaks (sowohl D-Hexosamin-Gehalt wie [^{3}H]-Radioaktivität) stimmten mit dem vorher ermittelten Peak für D-Glucosamin überein. Der Gehalt der Probe an Hexosamin betrug ca. 30 % des theoretisch erwarteten.

Das isolierte [^{3}H]-markierte Material enthielt demnach neben Hyaluronat keine weiteren Glycosaminoglycane. Für diese Vermutung sprechen folgende Befunde:

- Nach Chromatographie an Dowex 1 X 2 (Abb. 11) zeigte sich bei einer NaCl-Konzentration von 0.5 M ein scharfer Peak. Die Maxima von Glucuronsäure-Gehalt und [^{3}H]-Radioaktivität stimmten überein. Nach (44) handelt es sich um Hyaluronat, andere Glycosaminoglycane eluieren bei höheren NaCl-Konzentrationen.
- Nach Hydrolyse und Chromatographie des Produkts an Dowex 50 WX 8 (Abb. 12) ließ sich, korrespondierend mit der [^{3}H]-Radioaktivität, nur D-Glucosamin als Bestandteil des Hyaluronats nachweisen.
- Im Kurzzeitversuch mit Pseudomonas aeruginosa zeigte das isolierte Material (3 mg/ml Endkonzentration) die gleiche biologische Aktivität wie natives Hyaluronat. Frühere Versuche mit Chondroitinsulfat und Heparin zeigten dagegen, daß diese Polysaccharide im verwendeten Konzentrationsbereich (0.1 - 1 mg/ml) physiologisch unwirksam waren.

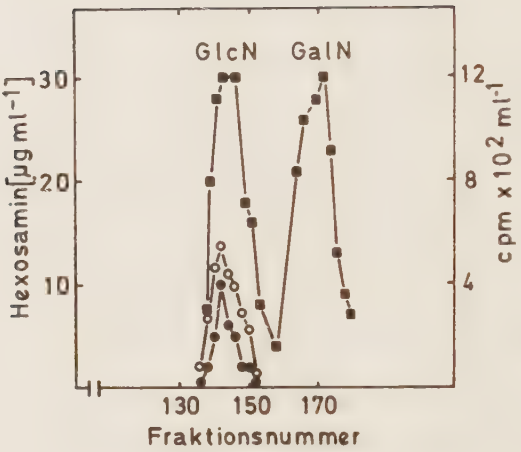

Abb. 12: Ionenaustauschchromatographie eines Hydrolysats des isolierten [^{3}H]-markierten Materials an Dowex 50 WX 8

In den Fraktionen wurde bestimmt:

● Hexosamin-Gehalt mit dem Test nach (46)

○ [^{3}H]-Radioaktivität

In einem getrennten Versuch wurde ein Gemisch aus 0.5 g D-Glucosamin (GlcN) und 0.5 g D-Galactosamin (GalN) unter gleichen Bedingungen chromatographiert und der Gehalt der Fraktionen an Hexosamin (■) bestimmt.

Über die chemische Konsistenz der Verunreinigung des isolierten [^{3}H]-Hyaluronats können zur Zeit nur Vermutungen angestellt werden. Da im Verlaufe der Isolierung mehrfach mit hohen Salzkonzentrationen gearbeitet wurde (Ethanol-Fällung mit 1.2 % Kaliumacetat, Extraktion mit 0.25 M $MgCl_2$), könnte es sich um Salze handeln, die aufgrund von ionischer Wechselwirkung mit

Hyaluronat-Molekülen durch Dialyse nicht abtrennbar wären. Diese Vermutung steht in Übereinstimmung mit Erfahrungen, die bei früheren Isolierungen von [^{3}H]-Hyaluronat gemacht wurden (Prof. K. von Figura, mündliche Mitteilung).

3.2.3.4 Bindeversuche mit [^{3}H]-Hyaluronat

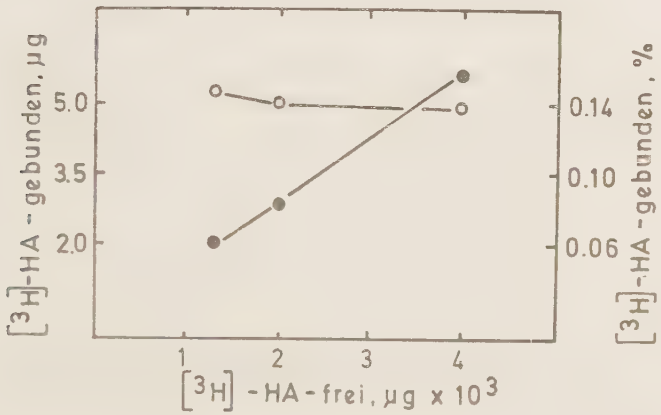

Abb. 13: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von [^{3}H]-Hyaluronat an Pseudomonas aeruginosa

● Beziehung zwischen der Konzentration an eingesetztem (freiem) und gebundenem [^{3}H]-Hyaluronat

○ Beziehung zwischen der Konzentration an eingesetztem [^{3}H]-Hyaluronat und dem prozentual gebundenen Anteil

Alle Angaben sind bezogen auf eine Zellzahl von 1×10^9 Bakterien.

Mit Hilfe der Zentrifugationsmethode (siehe 2.5.6) wurde gezeigt, daß das isolierte [^{3}H]-Hyaluronat an Pseudomonas aeruginosa bindet. Das markierte Hyaluronat wurde wegen der beschriebenen Verunreinigung in höheren Konzentrationen (1.4 - 6.2 mg/10^9 Bakterien) eingesetzt als P_r-HA und [^{14}C]-HA_m. Abb. 13 zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen der Menge an eingesetztem und der Menge an gebundenem [^{3}H]-Hyaluronat. Die prozentual gebundene Menge nahm mit zunehmender Konzentration geringfügig ab. Die eingesetzten und gebundenen Mengen sind in µg des isolierten Produkts angegeben, da das Molekulargewicht des Produkts nicht bestimmt wurde.

3.2.3.5 Herstellung und Charakterisierung von [^{14}C]-Methyl-Hyaluronat

In Vorversuchen wurden 32 µmol unmarkiertes MNT mit KOH umgesetzt und das entstehende Diazomethan mit Hyaluronat zur Reaktion gebracht. Das nicht methylveresterte Hyaluronat wurde zur Bestimmung der Ausbeute mit 0.01 N NaOH gegen Phenolphtalein-Indikator zurücktitriert. Die biologische Aktivität der isolierten Produkte wurde im Kurzzeitversuch mit Pseudomonas aeruginosa untersucht. Optimale Ausbeuten ergaben sich unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen (siehe 2.6.1.2).

Es wurden 17.05 mg [^{14}C]-HA_m mit einer spezifischen Aktivität von 3 x 10^6 cpm/µmol isoliert. Eine Abschätzung der Ausbeute ergab etwa eine [^{14}C]-Methyl-Gruppe pro zehn Disaccharideinheiten des Hyaluronats. Die Bestimmung der Radioaktivität getrennt eingewogener Proben des isolierten Produkts ließ vermuten, daß die [^{14}C]-Methyl-Gruppen nicht statistisch über die eingesetzten Hyaluronat-Moleküle verteilt waren. Die Erklärung hierfür liegt vermutlich in der Tatsache, daß festes Hyaluronat in Ether mit Diazomethan zur Reaktion gebracht wurde (näheres siehe 4.). Daher wurde von jeder in die Bindeversuche eingesetzten Probe vorher die spezifische Radioaktivität bestimmt. Kurzzeitversuche mit dem markierten Produkt ergaben eine gegenüber nativem Hyaluronat um 10 - 20 % geringere biologische Aktivität.

2.3.6 Bindeversuche mit [^{14}C]-Methyl-Hyaluronat

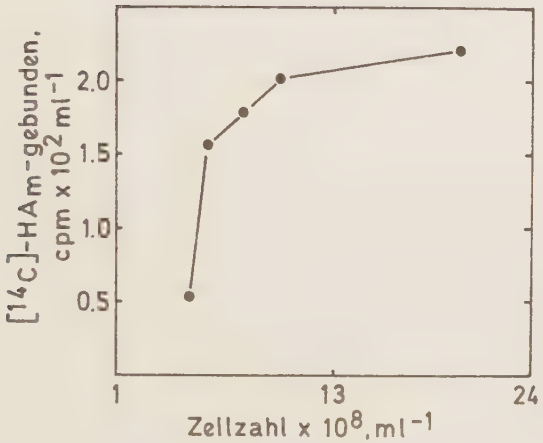

Abb. 14: Abhängigkeit der Bindung von [^{14}C]-HA_m an Pseudomonas aeruginosa von der Zellzahl/ml bestimmt mit der Filtrationsmethode

Mit der Filtrationsmethode (siehe 2.5.6) wurde gezeigt, daß [^{14}C]-HA_m an Pseudomonas aeruginosa bindet. Der Kurvenverlauf in Abb. 14 zeigt, daß die Menge an gebundenem Hyaluronat bis zu einer Zelldichte von 1 x 10^9 Bakterien/ml deutlich zunahm, bis 2 x 10^9 Bakterien/ml dann einer Sättigung zuzustreben schien. Mit höheren Zelldichten konnte nicht gearbeitet werden, da die verwendeten Membranen dann nahezu undurchlässig wurden und ein effektiver Waschvorgang (siehe 2.5.6) nicht mehr gewährleistet war. In Kontrollversuchen wurde die unspezifisch an die Membranen gebundene Radioaktivität ermittelt und die in Anwesenheit von

Bakterien gemessene Radioaktivität entsprechend korrigiert. Die Menge an unspezifisch gebundenem Material variierte deutlich von Versuch zu Versuch; daher wurden die Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Bindung mit der Zentrifugationsmethode durchgeführt.

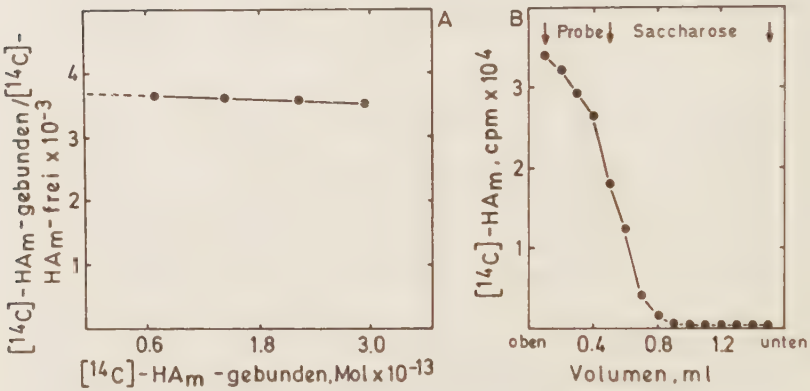

Abb. 15: Nachweis der Bindung von [^{14}C]-Methyl-Hyaluronat an Pseudomonas aeruginosa mit der Zentrifugationsmethode

A: Scatchard-Auftragung der Bindung von [^{14}C]-HA$_m$ in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration.

Die Angaben sind bezogen auf eine Zellzahl von 1 x 10^9 Bakterien.

B: Vertikale Verteilung der [^{14}C]-Radioaktivität im Reaktionsgefäß nach einem Zentrifugationsversuch mit 0.25 mg [^{14}C]-HA$_m$ in Abwesenheit von Bakterien.

Abb. 15-B zeigt, daß nach einem Zentrifugationsexperiment in Abwesenheit von Bakterien die auf die Saccharose-Lösung (Volumen: 1 ml) aufgetragene radioaktive Probe (Volumen: 0.5 ml)

nur etwa bis zur Hälfte in die Saccharose-Lösung eindrang. Die in der unteren Hälfte des Reaktionsgefäßes nachweisbare Radioaktivität betrug etwa 0.01 % der eingesetzten. Analoge Ergebnisse wurden bei Kontrollversuchen mit $[^3H]$-HA und P_r-HA erhalten (Ergebnisse nicht dargestellt). Mit Hilfe der Zentrifugationsmethode konnte also der Anteil an "background-Radioaktivität" im Vergleich zur Filtrationsmethode auf ein vernachlässigbares Maß reduziert werden.

Die Bindung von $[^{14}C]$-HA_m an Pseudomonas aeruginosa wurde mit Konzentrationen von 0.125 - 0.5 mg/10^9 Bakterien an markiertem Material untersucht. Von allen eingesetzten Konzentrationen wurden etwa 0.16 % an die Bakterien gebunden. Eine Analyse der gemessenen Daten erfolgte durch Auftragung der Ergebnisse nach Scatchard (Abb. 15-A). Die Dissoziationskonstante (K_d) wurde abgeschätzt als negativ-reziproke Steigung der dargestellten Geraden, die Sättigungskonzentration (B_{max}) als Produkt aus dem Ordinatenabschnitt und K_d (129). Es ergaben sich als Dissoziationskonstante

$$K_d = 1.58 \times 10^{-9} \text{ Mol}^*$$

und als Sättigungskonzentration

$$B_{max} = 5.85 \times 10^{-12} \text{ Mol}^*$$

Da die Konzentrationen jeweils auf eine Zellzahl von 1×10^9 Bakterien bezogen waren, konnte als Schätzwert eine maximal gebundene Menge von 2.34×10^{-14} g $[^{14}C]$-HA_m pro Bakterienzelle ermittelt werden.

*Fußnote: $K_d = \frac{3.16 \times 10^{-13}}{0.20 \times 10^{-3}}$ Mol

$B_{max} = 3.7 \times 10^{-3} \times 1.58 \times 10^{-9}$ Mol

3.3 Chromatographie von Exolipase an Hyaluronat-Gelen

3.3.1 Kovalent vernetztes Hyaluronat

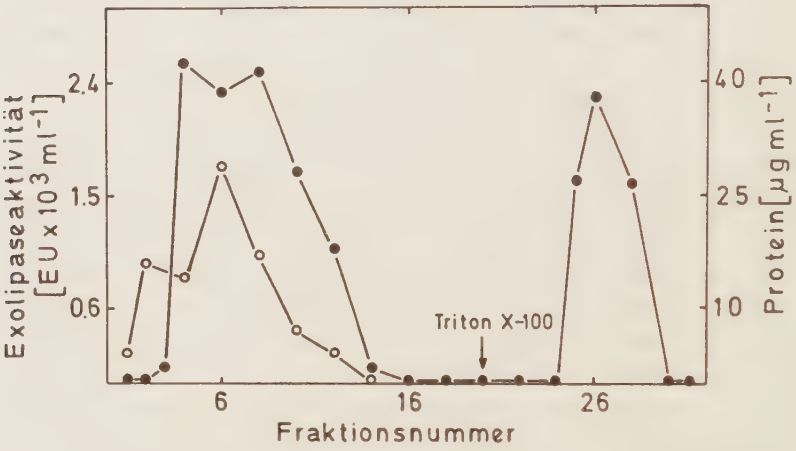

Abb. 16: Chromatographie vorgereinigter Exolipase von Pseudomonas aeruginosa an einem Gel aus quervernetztem Hyaluronat

Als Elutionsmittel diente zunächst Tris-NaCl-Puffer (50 mM), dann (Pfeil) der gleiche Puffer mit 2 % (v/v) Triton X-100. In den Fraktionen wurde bestimmt:

- ● Exolipaseaktivität mit dem Test nach (137)
- ○ Proteingehalt mit dem Test nach (90)

Aus Kulturüberständen von Pseudomonas aeruginosa wurden jeweils etwa 10 mg eines Exolipase-haltigen Lyophilisats mit einer Lipaseaktivität von 7 - 8 x 10^4 EU/mg gewonnen (siehe 2.5.2) Der Proteingehalt lag in verschiedenen Präparationen zwischen 50 und 300 µg/mg Lyophilisat, so daß die spezifischen Aktivitäten der isolierten Exolipase-Präparate 0.2 - 1.5 x 10^3 EU/µg Protein betrugen. 0.5 ml einer Lösung aus vorgereinigter Exolipase (entsprechend 3 x 10^4 EU) in Tris-NaCl-Puffer wurden auf ein Gel aus kovalent vernetztem Hyaluronat (siehe 2.6.5) aufgetragen.

Der zum Waschen benutzte Tris-Puffer enthielt 0.1 M NaCl zur Stabilisierung des Hyaluronat-Gels (87). Vorversuche zeigten, daß diese NaCl-Konzentration keinen Einfluß auf die Aktivität zellfreier Exolipase hatte. Durch Waschen mit Tris-NaCl-Puffer konnten, wie Abb. 16 zeigt, etwa 70 % der aufgetragenen Exolipaseaktivität eluiert werden. Gleichzeitig mit der Exolipaseaktivität erreichte der Proteingehalt der Fraktionen ein Maximum. Die auf der Säule verbliebene Exolipaseaktivität ließ sich durch weiteres Waschen mit Tris-NaCl-Puffer nicht eluieren. Versuche zur Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten (0.1 - 1 M) oder einer Lösung aus Hyaluronat-Oligosacchariden (5 mg/ml) blieben ebenfalls erfolglos. Durch Verwendung des nicht ionischen Detergenz Tritor X-100, das, wie Vorversuche zeigten, die Aktivität zellfreier Exolipase in der verwendeten Konzentration nicht beeinflußte, konnte die auf der Säule verbliebene Exolipaseaktivität eluiert werden. In den Lipase-haltigen Fraktionen war mit dem verwendeten Test (90) kein Proteingehalt nachweisbar, so daß es sich vermutlich um Exolipase hoher spezifischer Aktivität handelte.

2 Hyaluronat-Polyacrylamid-Gel

Häufig benutzte Matrices zur Kopplung von Liganden für die Affinitätschrometographie sind Derivate von Agarose (z. B. Sepharose - Fa. Pharmacia) oder Agarose-Acrylamid-Gemische (z. B. AcA-Gele - Fa. LKB). In früheren Versuchen wurde gefunden, daß Exolipase-Präparationen von Pseudomonas aeruginose von solchen Agarose-Gelen quantitativ gebunden wurden, bevor noch Hyaluronat-Oligosaccharide an die entsprechende Matrix gekoppelt waren. Es wurde daher als Matrix ein derivatisiertes Polyacrylamid-Gel (Affi-Gel 701 - Fa. Bio Rad) gewählt und ein Gemisch von Hyaluronat-Oligosacchariden mit Carbodiimid kovalent an das Gel gekoppelt (siehe 2.6.6). Die Kontrolluntersuchungen nach erfolgter Kopplungsreaktion ergaben einen Gehalt von 0.3 µg Hyaluronat pro mg trockenem Gel; das Kontrollgel enthielt kein Hyaluronat. Wegen der geringen Größe der Gelpar-

Proben-Nr.	Exolipaseaktivität eingesetzt[1.] ($EU \times 10^3\ ml^{-1}$)	Exolipaseaktivität gebunden an Kontrollgel[2.] (%)	Exolipaseaktivität gebunden an HA-Gel[2.] (%)
1	0.5	68	75
2	1.0	70	70
3	1.5	64	69
4	2.0	66	61

Tab. 9: Bindung vorgereinigter Exolipase von Pseudomonas aeruginosa an Hyaluronat-gekoppeltes Affi-Gel

1. bestimmt nach Inkubation in Abwesenheit von Gel (entspricht jeweils 100 %)
2. bestimmt als Differenz zu der im Überstand meßbaren Exolipaseaktivität nach Inkubation mit dem Kontrollgel bzw. dem Hyaluronat-gekoppelten Gel

Alle Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

tikel (Durchmesser 1 - 3 µm) war die Verwendung einer Säule zur Affinitätschromatographie nicht möglich, da alle käuflichen Membranen am Säulenausfluß für das Gel durchlässig waren und bakteriendichte Membranen verstopft wurden (bestätigt nach Rücksprache mit dem Hersteller). Die Untersuchungen wurden daher mit dem sogenannten "batch-Verfahren" durchgeführt (siehe 2.8.4). Kontrollversuche hatten gezeigt, daß variierend mit der Menge an eingesetzter Exolipase maximal etwa 70 % des Enzyms an unbehandeltes Gel gebunden wurden.

Die in Tab. 9 dargestellten Ergebnisse zeigten, daß im Falle der niedrigsten eingesetzten Exolipaseaktivität (Probe Nr. 1) durch das Hyaluronat-Gel 7 % mehr Enzym gebunden wurde als durch das Kontrollgel, diese Tendenz sich aber bei höheren eingesetzten Enzymaktivitäten nicht fortsetzte. Es wird daher gefolgert, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine signifikant höheren Mengen von Exolipase an Hyaluronat-gekoppeltes Gel gebunden wurden als an das Kontrollgel.

DISKUSSION

Wirkung von Hyaluronat auf die Exolipaseaktivität von *Pseudomonas aeruginosa*

- Natives Hyaluronat. Die Behandlung einer Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* mit Hyaluronat führte zu einer mindestens zehnfachen Erhöhung der Aktivität extrazellulärer Lipase. Sogenannte Kurzzeitversuche (siehe 2.5.1) erlaubten, diese physiologische Wirkung von Hyaluronat innerhalb eines Zeitraumes von maximal 60 min bei konstant bleibender Zelldichte in chemisch definiertem Milieu zu untersuchen. Hierbei wurde eine Abhängigkeit der Exolipaseaktivität sowohl von der Bebrütungszeit wie von der Hyaluronatkonzentration gefunden. Die graphische Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 4-8) zeigt einen Sättigungsbereich, was vermuten läßt, daß für die Hyaluronat-Moleküle eine begrenzte Anzahl von hypothetischen "Interaktionsstellen" mit den Bakterien und/oder der Exolipase existiert.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Frage der chemischen und strukturellen Eigenschaften des Hyaluronats, die für dessen physiologische Wirksamkeit gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* von essentieller Bedeutung sind, wurde zunächst eine Molekulargewichtsbestimmung mit viskosimetrischen Daten durchgeführt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten durch Vergleich von Ergebnissen, die mit Lichtstreuungsmessungen, Ultrazentrifugationsexperimenten und Viskositätsmessungen erhalten wurden, für verschiedene Hyaluronat-Präparate empirische Beziehungen zwischen der sogenannten 'limiting viscosity number' und dem Molekulargewicht ermitteln (28, 86, 118). Das mit Hilfe der hier verwendeten Beziehung (7) gefundene Molekulargewicht von 4×10^6 liegt im Bereich anderer für Hyaluronat publizierter Werte ($1 - 6 \times 10^6$) (88).

- Hyaluronat-Oligosaccharide. Nach partiellem enzymatischen Abbau von Hyaluronat und Molekularsiebchromatographie wurden vier Oligosaccharid-Präparate (bestehend aus zwei bis fünf Disaccharid einheiten) mit befriedigender Ausbeute isoliert. Die Identifizierung der einzelnen Oligosaccharide erfolgte aufgrund ihrer aus den Verteilungskoeffizienten ermittelten Molekulargewichte. Zur Oligosaccharid-Isolierung sind in der Literatur zahlreiche molekularsiebchromatographische Verfahren beschrieben, die sich sowohl in der Art der verwendeten Gelmatrices wie in den Methoden der Charakterisierung des isolierten Materials unterscheiden (26, 32, 56, 78, 79, 119). Die hier durchgeführte Methode erwies sich sowohl nach Ausbeute wie nach Reinheit der Präparate als den in der Literatur beschriebenen gleichwertig. Eine limitierende Mindestgröße des Hyaluronat-Moleküls konnte mit den Untersuchungen zur physiologischen Wirksamkeit der isolierten Oligosaccharide nicht festgestellt werden. Bedingt durch die Wirkungsweise der zum enzymatischen Partialabbau von Hyaluronat verwendeten testes-Hyaluronidase als Transglykosylase (61) entstanden als kleinste Oligosaccharide Tetrasaccharide, die jedoch immer noch eine, wenn auch deutlich herabgesetzte, physiologische Wirksamkeit zeigten. Kürzlich wurde durch Untersuchungen mit Circulardichroismus und ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie gezeigt, daß Hyaluronat-Oligosaccharide bis hinab zur Größe des Tetrasaccharids die für hochpolymeres Hyaluronat charakteristische Fähigkeit haben, zwischen Carboxylgruppen der Glucuronsäure und Acetamidogruppen des N-Acetyl-Glucosamins Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, was zur Ausprägung einer Sekundärstruktur führt (32, 116). Nur mit Oligosacchariden, die kleiner als das Tetrasaccharid sind, könnte demnach geklärt werden, ob eine solche Sekundärstruktur notwendige Voraussetzung für die physiologische Wirksamkeit von Hyaluronat-Oligosacchariden gegenüber Pseudomonas aeruginosa ist.

- Methylverestertes Hyaluronat. Durch Behandlung mit einem Überschuß an Diazomethan wurden die Carboxylgruppen der Glucuronsäureeinheiten von Hyaluronat quantitativ in die entsprechenden Methylester überführt. Damit geht der polyanionische Charakter des Moleküls verloren; die Fähigkeit zu intermolekularen Interaktionen und damit zur Ausbildung von Tertiär- und Quartärstrukturen dürfte nach (95, 132) eingeschränkt sein. Diese Vermutung ist vereinbar mit dem beobachteten deutlichen Rückgang der viskosen Eigenschaften von Hyaluronat-Lösungen nach Methylveresterung. Die Methylveresterung beeinträchtigte jedoch die physiologische Wirksamkeit von Hyaluronat nicht. Im Gegensatz zu unbehandeltem Hyaluronat ließ sich für das methylveresterte Präparat im Bereich geringer Konzentrationen eine lineare Beziehung zwischen physiologischer Wirksamkeit und Konzentration feststellen. Es wird vermutet, daß durch Einführung einer Methylgruppe bei gleichzeitigem Verlust der Ladung die Fähigkeit des Moleküls verbessert wird, hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen, was, wie später diskutiert wird, für eine Interaktion mit der äußeren Membran von Pseudomonas aeruginose von Bedeutung wäre.

- Reduziertes Hyaluronat. Die Bedeutung der reduzierenden N-Acetyl-Glucosamin-Reste in einem Gemisch aus Hyaluronat-Oligosacchariden für deren physiologische Wirksamkeit wurde untersucht, indem diese mit Natriumborohydrid zu den entsprechenden N-Acetyl-Glucosaminitolen reduziert wurden (101). Der damit einhergehende Verlust an physiologischer Wirksamkeit von etwa 20 % war reversibel. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Hyaluronat-Oligosaccharide bis zu einem Molekulargewicht von ca. 5 000 einheitlich eine um etwa 30 % geringere physiologische Wirksamkeit haben als natives Hyaluronat, läßt sich schließen, daß intakte reduzierende N-Acetyl-Glucosamin-Reste von Bedeutung sind. Möglicherweise sind sie direkt beteiligt an einer Interaktion, die das Hyaluronat-Molekül zur Entfaltung seiner Wirksamkeit mit der äußeren Membran von Pseudomonas aeruginosa eingehen muß. Eine veränderte oder gestörte Fähig-

keit zur Ausbildung von Sekundärstrukturen und zu intermolekularen Wechselwirkungen ist in reduziertem Hyaluronat ebenfalls wahrscheinlich, kann jedoch aufgrund der mit Oligosacchariden und mit methylverestertem Hyaluronat erhaltenen Ergebnisse zumindest nicht ausschließlich für den Rückgang der physiologischen Wirksamkeit verantwortlich gemacht werden.

- Schlußfolgerungen. Proteoglycane sind komplexe Makromoleküle, bestehend aus einem oder mehreren Glycosaminoglycanen, die kovalent an ein "core-Protein" gebunden sind. Hyaluronat geht spezifische, nicht kovalente Bindungen mit Proteoglycan-Monomeren ein, was zur Bildung hochmolekularer Aggregate führt (57, 58). Durch Methylveresterung, Reduktion und Deacetylierung von Hyaluronat-Oligosacchariden konnte gezeigt werden, daß für eine effektive Bindung an Proteoglycane ein Hyaluronat-Decasaccharid mit intakten Carboxylgruppen und reduzierendem N-Acetyl-Glucosamin-Terminus vorhanden sein muß (23, 25, 26). Die physiologische Wirkung von Hyaluronat auf Pseudomonas aeruginosa scheint, wie später diskutiert wird, ebenfalls eine nicht kovalente Bindung an Protein- oder Glycan-Strukturen der äußeren Membran voreuszusetzen. Für eine möglichst effektive physiologische Wirksamkeit ist ein Oligosaccharid aus mehr als fünf Disaccharideinheiten mit reduzierendem N-Acetyl-Glucosamin-Terminus erforderlich. Abweichend von den oben zitierten Untersuchungen scheint der polyanionische Charakter nicht erforderlich zu sein, da methylverestertes Hyaluronat in seiner Wirksamkeit nicht beeinträchtigt ist und, wie gezeigt werden konnte, an Pseudomonas aeruginose bindet. Natives Hyaluronat bildet in Lösung eine dreidimensionale, geordnete Matrix aus solvatisierten, zu sphärischen Molekülen gefalteten Ketten, deren Struktur erst kürzlich elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht wurde (52). Einzelne Kettenmoleküle können, wie oben dargelegt wurde, sowohl intra- wie intermolekulare Wechselwirkungen eingehen, die durch chemische Modifikationen der involvierten funktionellen Gruppen gestört oder verhindert werden. Aufgrund der mit Hyal-

uronat-Oligosacchariden erhaltenen Ergebnisse kann vermutet werden, daß als minimale Voraussetzung für eine physiologische Wirksamkeit eine, vielleicht gestörte, Sekundärstruktur der Hyaluronat-Moleküle erforderlich ist. Übergeordnete Tertiär- oder Quartärstrukturen scheinen, wie die Versuche mit methylverestertem Hyaluronat nahelegen, nicht notwendig zu sein. Da in der Literatur nicht über Strukturuntersuchungen mit chemisch modifiziertem Hyaluronat berichtet wird, haben die Überlegungen betreffend die für eine physiologische Wirksamkeit minimalen strukturellen Voraussetzungen von Hyaluronat jedoch hypothetischen Charakter.

Interaktion von Hyaluronat mit Pseudomonas aeruginosa

Über die molekulare Struktur und Funktion der äußeren Membran gram-negativer Bakterien sind in den letzten Jahren detaillierte Vorstellungen gewonnen worden (zur Übersicht siehe 35, 103). Verglichen mit der inneren oder Cytoplasmamembran enthält sie weniger Phospholipide und Proteine sowie einen einheitlichen, kohlenhydrathaltigen Anteil, das Lipopolysaccharid (LPS). Sie wirkt als Diffusionsbarriere (z.B. für Antibiotika), ist an Konjugations- und Zellteilungsprozessen beteiligt, enthält Rezeptoren für Phagen und Colicine sowie verschiedene spezifische Nährstoffaufnahmesysteme (z.B. für Eisen, Vitamine und Kohlenhydrate) und unspezifische Poren, die die passive Diffusion von niedermolekularen Substanzen erlauben. Bei Untersuchungen der äußeren Membran von Pseudomonas aeruginosa wurden bislang neun in vergleichsweise großer Menge vorkommende Proteine (sogenannte "major proteins") gefunden, die nach der von Hancock vorgeschlagenen Nomenklatur mit den Buchstaben D1, D2, E, F, G, H1, H2, J und P bezeichnet werden (53, 93). Die Proteine F, H2 und J sind nicht kovalent mit dem Peptidoglycan assoziiert (54), wobei das Protein J offenbar dem Braun'schen Lipoprotein von E. coli entspricht (94); die Proteine F, D1 und P sind Porine, die wassergefüllte Poren in der äußeren

Membran bilden (55). Neben diesen Membranproteinen ist das LPS als charakteristische Komponente der äußeren Membran für deren strukturelle Organisation von dominierender Bedeutung. Pseudomonas aeruginosa-LPS enthält u.a. etwa 3 % KDO und wahrscheinlich einen im Vergleich zu dem LPS der Enterobacteriaceae ungewöhnlich hohen Anteil an Phosphat-Resten (71, 83, 136).

Zur Untersuchung der Frage, ob die physiologische Wirksamkeit von Hyaluronat eine Interaktion mit der äußeren Membran von Pseudomonas aeruginosa voraussetzt, wurden drei verschiedene Versuchsserien durchgeführt.

- EDTA-Behandlung. EDTA komplexiert zweiwertige Ionen wie Ca^{++} und Mg^{++}, die über kationische Brückenbindungen Proteine und LPS in der äußeren Membran stabilisieren (135). Hochmolekulare Komplexe aus Membranproteinen und nicht kovalent gebundenem LPS werden freigesetzt, wenn Pseudomonas aeruginosa mit EDTA behandelt wird (59). Ein Indiz hierfür war die Zunahme an Protein- und KDO-Gehalt im Überstand nach Behandlung der Zellen mit EDTA und anschließender Zentrifugation. Basierend auf einem Gehalt von 38.4×10^{-9} µg LPS pro Zelle (82) konnte geschätzt werden, daß etwa 50 % des vorhandenen LPS freigesetzt wurden. Die Behandlung mit einer EDTA-Konzentration von 0.1 mM überlebten etwa 80 % der Bakterien, die physiologische Wirksamkeit von Hyaluronat gegenüber diesen Zellen war jedoch deutlich (um ca. 85 %) erniedrigt. Partielle "Reparatur" der nach EDTA-Behandlung entstandenen Membranschädigungen führte zu einer Erhöhung der physiologischen Wirksamkeit von Hyaluronat. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß nach EDTA-Behandlung unter den freigesetzten Komponenten keine enzymatisch aktive Lipase ist, wird der Schluß nahegelegt, daß Hyaluronat mit Bestandteilen der äußeren Membran interagiert, die durch EDTA-Behandlung zumindest teilweise entfernt werden können. Wie später ausführlich diskutiert wird, scheint Exolipase von Pseudomonas aeruginosa vor ihrer Freisetzung in den extrazellulären Raum

an die äußere Membran gebunden vorzuliegen. Eine Interaktion von Hyaluronat mit den Lipasemolekülen selbst oder Membranbestandteilen, die an dieser vorübergehenden Bindung der Lipasemoleküle beteiligt sind, würde somit zur Freisetzung vorher zellgebundener Exolipase führen. Diese Hypothese impliziert die Forderung, daß alle Änderungen in der Struktur der äußeren Membran, die entweder die Bindestellen für Exolipase oder die für Hyaluronat beträfen, zu einer Veränderung des Mechanismus der Freisetzung von Exolipase bzw. der physiologischen Wirksamkeit von Hyaluronat führen würden. Diese durch die Versuche mit EDTA-behandelten Bakterien nahegelegte Vermutung bestätigte sich in Versuchen mit phagenresistenten Mutanten.

- Phagenresistente Mutanten. Unter den gegen fünf verschiedene Phagen isolierten unabhängigen Resistenzmutanten fanden sich Klone, die bereits in Abwesenheit von Hyaluronat signifikant höhere Mengen an Exolipase freisetzten als die entsprechenden Wildtypstämme. Hyaluronat-Behandlung konnte die Exolipaseaktivität nur noch geringfügig oder gar nicht erhöhen. Die isolierten Mutanten erwiesen sich als adsorptionsresistent, was vermuten läßt, daß die in Wildtypstämmen vorhandenen Rezeptoren, hier also LPS und Protein (99), mutativ verändert waren oder gänzlich fehlten. Die Literatur berichtet über eine Reihe von phagenresistenten Mutanten von Pseudomonas aeruginose, deren Resistenz auf mutativer Veränderung der Rezeptoren beruht (22, 70, 72, 82, 99). Auswirkungen der durch Phagenresistenz veränderten Struktur der äußeren Membran auf die vorhandene Menge bzw. die biologische Aktivität extrazellulärer Produkte werden beschrieben für das Glycolipoprotein von Pseudomonas aeruginosa (33) und ein polyanionisches Heteropolysaccharid, das sogenannte Emulsan von Acinetobacter calcoaceticus (105). In Analogie dazu wird vermutet, daß die deutlich eingeschränkte physiologische Wirksamkeit von Hyaluronat gegenüber einigen phagenresistenten Mutanten darauf beruht, daß die vorübergehende Bindung von Exolipase an die äußere Membran gestört

ist und damit auch ohne Einwirkung von Hyaluronat bereits signifikant höhere Mengen an Enzymmolekülen freigesetzt werden als in entsprechenden Wildtypstämmen. Für die Beteiligung von LPS an der Bindung von Exolipase an die äußere Membran sprechen die spontanen Exolipaseaktivitäten, die mit Resistenzmutanten gegen LPS-spezifische Phagen gefunden wurden und die deutlich höher sind als die von Wildtypstämmen oder Resistenzmutanten gegen Protein-spezifische Phagen.

- Bindeversuche. Die in Versuchen mit EDTA-behandelten Bakterien und phagenresistenten Mutanten erhaltenen Ergebnisse deuteten also darauf hin, daß die physiologische Wirksamkeit von Hyaluronat mit einer Bindung des Polysaccharids an Pseudomonas aeruginose korrelliert war. Um diese Bindung direkt nachweisen zu können, war es notwendig, Hyaluronat zu markieren. Zunächst wurde mit Procion-Rot ein Reaktivfarbstoff kovalent an Hyaluronat gekoppelt, der ein Absorptionsmaximum bei 530 nm hatte und damit photometrisch erfassbar war. Die Procionfarbstoffe enthalten eine chromophore Gruppe, deren Struktur ausschließlich in der Patentliteratur publiziert ist und als reaktive Gruppe einen Dichlortriazinyl-Ring, der mit Hydroxyl- oder Aminogruppen nach dem Mechanismus einer Additions-Eliminations-reaktion kovalente Bindungen eingeht und daher zur Färbung von Polysacchariden (z.B. Cellulose und Stärke) verwendet wurde (50, 75). Der hier erzielte Anfärbungsgrad (ein gebundenes Procion-Rot-Molekül pro 160 Disaccharideinheiten des Hyaluronats) ließ sich, auch durch Erhöhung der Farbstoffkonzentration im Reaktionsansatz, nicht weiter erhöhen. Dies ist erklärbar zum einen durch den Mangel an primären Hydroxylgruppen im Hyaluronat, mit denen Dichlortriazine etwa zehnmal häufiger reagieren als mit sekundären Hydroxylgruppen (37), zum anderen durch sterische Hinderung, da die helicale Struktur von Hyaluronat zu einer Abschirmung eines Teils der zur Helixachse gerichteten Hydroxylgruppen führt. Das an Bakterien gebundene Produkt konnte nicht,

wie ursprünglich geplant, quantitativ spektrophotometrisch erfaßt werden, es wurde daher eine Abschätzung der Menge an gebundenem Material mit der wesentlich empfindlicheren Methode der Fluoreszenzspektroskopie vorgenommen.
Zur Gewinnung radioaktiv markierten, jedoch chemisch nicht modifizierten Hyaluronats wurde arterielles Gewebe in Anwesenheit von [^{3}H]-Glucosamin in vitro inkubiert. Radioaktiv markiertes Glucosamin wird unter diesen Bedingungen in die im Bindegewebe synthetisierten Glycosaminoglycane eingebaut, die dann mit konventionellen Methoden getrennt und isoliert werden können (44). Nach vergleichsweise langwieriger und experimentell aufwendiger Isolierung konnte gezeigt werden, daß das markierte Material etwa 30 % [^{3}H]-Hyaluronat enthielt, daneben jedoch keine weiteren Glycosaminoglycane. Da [^{3}H]-Hyaluronat in der isolierten Form physiologisch ebenso wirksam war wie natives Hyaluronat, wurde es ohne weitere Reinigung in die Bindeversuche eingesetzt.
Die physiologische Wirksamkeit von methylverestertem Material legte nahe, eine Markierung durch Veresterung von Hyaluronat mit [^{14}C]-Diazomethan einzuführen. Aus einer geringen Menge der radioaktiv markierten Ausgangssubstanz MNT (6.9 mg) wurde zunächst gasförmiges [^{14}C]-Diazomethan freigesetzt, das dann mit festem Hyaluronat zur Reaktion gebracht wurde. Zur Erzielung optimaler Ausbeuten war es daher notwendig, eine Mikroapparatur zu entwickeln. Während der Durchführung der Experimente wurde eine Methode zur Darstellung geringer Mengen von Diazomethan mit einer Mikroapparatur ähnlich der in Abb. 2 dargestellten publiziert (21). Eine effektive Veresterung zu erzielen wird durch die Tatsache erschwert, daß Hyaluronat nur in Wasser befriedigende Löslichkeit zeigt, Diazomethan dagegen in weniger polaren Lösungsmitteln wie Ether oder Methanol löslich ist. Zahlreiche Vorversuche in einem Zweiphasensystem aus etherischer Diazomethanlösung und wäßriger Hyaluronat-Lösung brachten trotz intensiver Durchmischung keine befriedigenden Ausbeuten. Unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen ist die vermutete nicht statistische Verteilung der eingeführten Methylgruppen erklär-

bar durch konformationsbedingte Abschirmung der Carboxylgruppen innerhalb des in fester Form vorliegenden Hyaluronats. Das isolierte Material war von hoher spezifischer Aktivität, so daß die im Picomol-Bereich liegenden Konzentrationen an zellgebundenem [^{14}C]-Hyaluronat nachweisbar waren. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Bestimmung geringster Mengen zellgebundenen radioaktiven Materials wird gestört durch unspezifisch an Reaktionsgefäße oder Membranen anhaftende Radioaktivität. Mit der hier verwendeten Zentrifugationsmethode wurde diese "background-Radioaktivität" auf ein vernachlässigbares Maß reduziert. Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Bindung von der Zellzahl mußte die Filtrationsmethode verwandt werden, da bei geringen Zelldichten nach Zentrifugation kein Sediment erkennbar war.

Alle markierten Hyaluronat-Präparate wurden an Pseudomonas aeruginosa gebunden. In allen Fällen war die Bindung abhängig von der Konzentration an markiertem Produkt; für [^{14}C]-HA_m konnte zusätzlich eine Abhängigkeit von der Zellzahl gezeigt werden. Wegen der bei den Fluoreszenzmessungen mit Procion-Rot-Hyaluronat auftretenden Störungen durch Eigenfluoreszenz der Bakterien einerseits und der Verwendung eines nicht vollständig reinen [^{3}H]-Hyaluronat-Präparates andererseits wurden die mit diesen Präparaten erhaltenen Bindungsdaten nicht nach Scatchard analysiert. Die Scatchard-Analyse der mit [^{14}C]-HA_m erhaltenen Daten (nach 129) ergab eine hohe Affinität des markierten Produkts zu den Bakterienzellen ($K_d = 1.6 \times 10^{-9}$ Mol) und eine Bindung von etwa 3×10^3 Molekülen pro Zelle im Sättigungsbereich. Mit Gleichgewichtsdialyse und Ultrafiltrationstechniken wurde die Bindung von [^{3}H]-Hyaluronat an Proteoglycane untersucht (29, 30, 100). Da, wie oben ausgeführt, pro Proteoglycanmonomer nur ein Hyaluronatmolekül gebunden werden kann, ist ein Vergleich der Ergebnisse mit den hier erhaltenen nicht sinnvoll. Bei Untersuchungen an Chondrocyten-Kulturen wurde gefunden, daß Hyaluronat zellgebunden vorliegt

und bei der Interaktion verschiedener Zellen untereinander sowie bei Anheftungs- bzw. Ablösungsvorgängen eine entscheidende Rolle spielt (1, 92). Eingehend charakterisiert wurde die Bindung von Hyaluronat an SV-40 transformierte 3T3-Zellen (128, 129, 130). Die dabei ermittelte Dissoziationskonstante und die Sättigungskonzentration sind interessanterweise nahezu identisch mit den für die Bindung an Pseudomonas aeruginosa ermittelten. Die Autoren vermuten, daß Hyaluronat an einen oder, bedingt durch seine repetitive Struktur, an mehrere Rezeptoren gleichzeitig binden kann, was die gefundene hohe Affinität erklären würde. Ausdrücklich wird darauf hingewiesen, daß gebundenes Hyaluronat aufgrund seiner molekularen Struktur andere Moleküle von der Zelloberfläche verdrängen bzw. deren Bindung verhindern kann (sogenannte "steric exclusion"). Obwohl die Unterschiede im chemischen und strukturellen Aufbau der Zellmembranen von Pro- und Eukaryontenzellen berücksichtigt werden müssen, sind die Parallelen mit den hier gefundenen Ergebnissen unübersehbar. Dennoch wäre es verfrüht, beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen Vermutungen über eventuell vorhandene Rezeptoren für Hyaluronat an Pseudomonas aeruginosa-Zellen anzustellen. Durch den Nachweis der Bindung von Hyaluronat ist ein kausaler Zusammenhang mit der dadurch vermittelten Freisetzung von Lipasemolekülen, d.h. mit der physiologischen Wirksamkeit von Hyaluronat, keineswegs bewiesen, zwei Befunde deuten aber darauf hin: 1. Alle markierten Hyaluronat-Proben, die unter Bedingungen eines Kurzzeitversuchs an die Bakterien binden, sind auch physiologisch wirksam. 2. Procion-Rot-markiertes Dextran, das zu den physiologisch unwirksamen Polysacchariden zählt, bindet nicht an die Bakterien.

Chromatographie von Exolipase an Hyaluronat-Gelen

Eine mögliche direkte Interaktion zwischen Hyaluronat und Exolipase von Pseudomonas aeruginosa wurde mit affinitätschromatographischen Methoden untersucht. In der Literatur wird von Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Plasma-Lipoproteinen und Albuminen mit quervernetztem Hyaluronat berichtet, das mit der beschriebenen Methode (87) isoliert wurde (60, 66). Zur Reinigung von Lipoprotein Lipase und Lipase von Rhizopus japonicus wurde mit Sepharose-Gelen gearbeitet, an die das dem Hyaluronat nahe verwandte Glycosaminoglycan Heparin kovalent gekoppelt war (3, 12). Bei Chromatographie eines vorgereinigten Exolipasepräparates von Pseudomonas aeruginosa an einem Gel aus quervernetztem Hyaluronat wurden etwa 30 % der aufgetragenen Aktivität retardiert. Die Bindung dieses Anteils der Exolipase an das Hyaluronat-Gel erfolgte vermutlich über hydrophobe Wechselwirkungen, da eine Elution mit dem nichtionischen Detergenz Triton X-100 möglich war. Die Neigung mikrobieller Lipasen, hydrophobe Wechselwirkungen sowohl intermolekular wie mit hydrophoben Liganden einzugehen, ist bekannt (73, 127). Es kann daher vermutet werden, daß die auf die Säule aufgetragene Exolipase-Präparation zum größeren Teil aus über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierten hochmolekularen Aggregaten bestand, die wahrscheinlich nicht interagieren, zum kleineren Teil aus nicht aggregierten Molekülen, deren Wechselwirkungen mit dem Gel durch Triton X-100 aufgehoben wurden. Gegen die Vermutung einer spezifischen Wechselwirkung dieser Exolipase mit dem Hyaluronat spricht, daß bei Versuchen zur Elution mit einem Gemisch aus Hyaluronat-Oligosacchariden kein Enzym von der Säule eluiert werden konnte. Zusätzliche Versuche mit vorgereinigter Exolipase zeigten eine hohe Affinität des Enzyms zu Octyl-Sepharose, eine Elution konnte durch Verwendung von Triton X-100 erreicht werden. Es ist daher denkbar, daß Lipase-Moleküle mit den durch die Kopplungsreaktion entstandenen hydrophoben aliphatischen

Gruppen im Gel wechselwirken. Die Tendenz der Exolipase zu hydrophoben Wechselwirkungen schloß, wie bereits berichtet, die in (24, 126) beschriebene Kopplung von Hyaluronat an aktivierte Sepharose aus. Eine bevorzugte Bindung von Exolipase an Hyaluronat-Affi-Gel gegenüber einem hyaluronatfreien Kontrollgel konnte nicht gezeigt werden. Bedingt durch den verhältnismäßig geringen Gehalt des Gels an Hyaluronat (0.3 µg/mg Trockengewicht) wird jedoch möglicherweise eine so geringe Menge an Exolipase gebunden, daß die Bindung im verwendeten Versuchssystem nicht nachweisbar ist. Mit Hilfe der verwendeten Methoden konnten keine direkten Hinweise für eine spezifische Interaktion zwischen Hyaluronat und der Exolipase von Pseudomonas aeruginosa gefunden werden, wie sie für die Interaktion zwischen Lipoprotein Lipase aus menschlichem Plasma und die Trehalose-Phosphat-Synthase von Mycobacterium smegmatis mit Heparin beschrieben wurden (12, 104). Solange jedoch nicht mit einem elektrophoretisch reinen Lipase-Präparat gearbeitet werden kann, ist dennoch die Möglichkeit einer solchen Interaktion nicht auszuschließen.

Hypothese zum Mechanismus der physiologischen Wirkung von Hyaluronat auf Pseudomonas aeruginosa

Exolipase von Pseudomonas aeruginosa gehört zu denjenigen Proteinen, die durch die Cytoplasmamembran und die äußere Membran in den extrazellulären Raum ausgeschieden werden. Alle zur Zeit publizierten Hypothesen zum Mechanismus der Sekretion von Proteinen (38, 39, 134) sind mit der Annahme vereinbar, daß später extrazellulär vorliegende Proteine zunächst vorübergehend in der äußeren Membran gelagert werden. Zusätzlich wurde für jeden Typ von membrangebundenem und extrazellulärem Enzym eine konstante Anzahl von Bindestellen an oder in der Membran gefordert (84) und vermutet, daß die Freisetzung der Enzyme von den Membranbindestellen ein limitierender Faktor für die Exoenzymbiosynthese ist (40). Im Einklang mit der zur Erklärung der stimulierenden Wirkung verschiedener Polysaccharide auf die

Exolipaseaktivität von Serratia mercescens vorgeschlagenen "Ablösungshypothese" (137) wird vermutet, daß durch eventuell reversible Bindung von Hyaluronat an Pseudomonas aeruginosa in der äußeren Membran bereits vorhandene Exolipasemoleküle freigesetzt werden, so daß als Konsequenz extrazellulär ein Anstieg der Lipaseaktivität meßbar wird. Hierbei scheint es eine begrenzte Anzahl von Bindestellen für Hyaluronat zu geben, deren chemische und strukturelle Beschaffenheit nicht bekannt sind. Versuche mit EDTA-behandelten Bakterien und phagenresistenten Mutanten legen die Beteiligung von LPS und/oder Proteinen an der Hyaluronat-Bindung nahe; beide Membranbestandteile scheinen ebenfalls an der Bindung von Exolipase an die äußere Membran beteiligt zu sein. In der Literatur wird von der Bindung des nicht metabolisierbaren Polysaccharids Amylopektin an ein Membranprotein von Escherichia coli berichtet (42); ein kürzlich publizierter hypothetischer Mechanismus für die Freisetzung alkalischer Phosphatase von Pseudomonas aeruginosa in den extrazellulären Raum sieht vor, daß das Enzym als Komplex mit LPS zeitweise in der äußeren Membran gelagert wird (16). Eine direkte Interaktion von Hyaluronat mit noch in der Membran befindlichen Exolipasemolekülen erscheint unwahrscheinlich, ist jedoch, insbesondere für vollständig methylverestertes Hyaluronat, das über hydrophobe Wechselwirkungen an Exolipase binden könnte, nicht auszuschließen. Bindung von Hyaluronat an die äußere Membran in der Nähe bereits vorhandener Exolipasemoleküle könnte diese von ihren Bindestellen verdrängen. Die Verdrängung von Molekülen durch Hyaluronat durch sogenannte "steric exclusion" ist beschrieben worden (31). Die nach Freisetzung von Exolipase in der Membran entstehenden "Lücken" scheinen aufgefüllt zu werden. Daß hierzu Proteinbiosynthese notwendig ist, belegen Versuche mit in Anwesenheit des Transkriptionsinhibitors Rifampicin vorbebrüteten Bakterien (Ergebnisse nicht dargestellt). Hyaluronat-Behandlung solcher Bakterien führt zu einem unmittelbaren Anstieg der Exolipase-

aktivität im extrazellulären Raum, mit fortschreitender Dauer der Bebrütung nimmt die Exolipaseaktivität jedoch kontinuierlich ab. Hyaluronat beeinflußt also neben der Freisetzung offenbar sekundär auch die Bildung extrazellulärer Lipase von Pseudomonas aeruginosa.

Über die molekularen Vorgänge, die in vivo zur Freisetzung der extrazellulären Enzyme führen, ist wenig bekannt. Untersuchungen mit Micrococcus sodonensis zeigten, daß von den Bakterien synthetisierte Exopolysaccharide bei der Freisetzung von Exoenzymen eine Rolle spielen (17). Mit isolierten Exopolysacchariden von Pseudomonas aeruginosa läßt sich ebenfalls eine Freisetzung extrazellulärer Lipase erzielen (Bohne, L., Winkler, U.K., Soc. Gen. Microbiol. Quarterly 6, 167 (1979)). Berücksichtigt man die Tatsache, daß in Exopolysaccharid von Pseudomonas aeruginosa Hyaluronat gefunden wurde (20), so wäre denkbar, daß durch Hyaluronat-Behandlung in vitro eine physiologische Wirkung simuliert wird, die in vivo von zelleigenen Exopolysacchariden ausgeübt wird. Ungeachtet dieser hypothetischen Überlegungen trägt die Aufklärung der Vorgänge, die der physiologischen Wirksamkeit von Hyaluronat zugrunde liegen, zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Bildung und Freisetzung extrazellulärer Lipase von Pseudomonas aeruginosa bei.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung einer Zellsuspension von Pseudomonas aeruginosa mit Hyaluronat führte zu einer mindestens zehnfachen Erhöhung der Aktivität extrazellulärer Lipase. Unter drei thematischen Schwerpunkten wurde der Mechanismus dieser physiologischen Wirkung von Hyaluronat untersucht.

I. Physiologische Wirksamkeit von chemisch und enzymatisch modifiziertem Hyaluronat

1. Hyaluronat-Oligosaccharide wurden aus nativem Hyaluronat, dessen Molekulargewicht viskosimetrisch mit 4×10^6 bestimmt worden war, durch enzymatische Partialhydrolyse und anschließende Molekularsiebchromatographie isoliert. Alle Oligosaccharide (bestehend aus zwei bis fünf Disaccharideinheiten), die durch gelchromatographische Molekulargewichtsbestimmung identifiziert wurden, waren physiologisch wirksam; ab der Größe des Octasaccharids nahm die physiologische Wirksamkeit deutlich zu.

2. Methylverestertes Hyaluronat wurde hergestellt durch Behandlung von Hyaluronat mit Diazomethan. Der durch quantitative Methylveresterung der Carboxylgruppen bedingte Verlust des polyanionischen Charakters von Hyaluronat beeinträchtigte dessen physiologische Wirksamkeit nicht.

3. Reduziertes Hyaluronat, erhalten durch Behandlung von partiell enzymatisch abgebautem Hyaluronat mit Natriumborohydrid, war um etwa 20 % weniger wirksam als unbehandeltes Polysaccharid. Schaffung neuer reduzierender N-Acetyl-Glucosamin-Termini durch Hyaluronidase-Behandlung des reduzierten Produkts ließ die physiologische Wirksamkeit auf den ursprünglichen Wert ansteigen.

Interaktion zwischen Hyaluronat und Pseudomonas aeruginosa

EDTA-Behandlung führte zu einer Schädigung der äußeren Membran von Pseudomonas aeruginosa, erkennbar an der Zunahme von extrazellulärem Lipopolysaccharid und Protein. Gegenüber derart membrangeschädigten Bakterien nahm die physiologische Wirksamkeit von Hyaluronat um etwa 80 % ab.

Phagenresistente Mutanten wurden isoliert gegen Pseudomonas aeruginosa-spezifische Phagen, die als Rezeptoren Lipopolysaccharid- und/oder Proteinbestandteile der äußeren Membran benötigen. Einige der Resistenzmutanten setzten bereits in Abwesenheit von Hyaluronat eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere Menge an Exolipase frei; die physiologische Wirksamkeit von Hyaluronat gegenüber diesen Mutanten war nahezu aufgehoben.

Bindeversuche wurden mit drei unterschiedlich markierten Hyaluronat-Derivaten durchgeführt. Procion-Rot wurde kovalent an Hyaluronat gekoppelt, [^{3}H]-Glucosamin durch in vitro Inkubation von arteriellem Rindergewebe in Hyaluronat eingebaut und [^{14}C]-Methyl-Hyaluronat durch Veresterung mit [^{14}C]-Diazomethan erhalten. Alle markierten Derivate waren physiologisch wirksam und wurden an Pseudomonas aeruginosa gebunden, die Bindung war abhängig von der Zellzahl und der Hyaluronat-Konzentration. Eine Analyse der mit dem [^{14}C]-markierten Produkt erhaltenen Bindungsdaten ergab eine hohe Affinität des Polysaccharids zu den Bakterien (K_d = 1.6 x 10^{-9} Mol) sowie eine maximale Bindung von etwa 3 x 10^{3} Molekülen pro Zelle.

I. Interaktion zwischen Hyaluronat und Exolipase

Kovalent-vernetztes Hyaluronat wurde als Matrix zur Affinitätschromatographie mit einem vorgereinigten Exolipase-Präparat verwendet. Von der auf die Säule aufgetragenen Aktivität wurden etwa 30 % retardiert, vermutlich aufgrund von Wechselwirkungen mit durch die Vernetzungsreaktion mit Butadienepoxid entstandenen hydrophoben aliphatischen Gruppen im Gel.

2. Hyaluronat-Polyacrylamid-Gel, hergestellt durch Kopplung von Hyaluronat-Oligosacchariden an eine Polyacrylamid-Matrix mit Carbodiimid, konnte im Vergleich zu hyaluronatfreiem Kontrollgel keine signifikant höheren Mengen an Exolipase binden.

Schlußfolgerungen: Für eine effektive physiologische Wirkung auf Pseudomonas aeruginosa ist ein Hyaluronat-Molekül aus fünf oder mehr Disaccharideinheiten mit reduzierendem N-Acetyl-Glucosamin-Terminus erforderlich. Der Verlust des polyanionischen Charakters von Hyaluronat bleibt ohne Auswirkung auf dessen physiologische Wirksamkeit, die vermutlich auf einer Bindung des Polysaccharids an die äußere Membran von Pseudomonas aeruginosa beruht. Der Mechanismus der Freisetzung von Exolipase wird diskutiert im Zusammenhang mit der nach Untersuchungen an Serratia marcescens formulierten "Ablösungshypothese" (137).

6. LITERATUR

1. Abatangelo, G., Cortivo, R., Martelli, M., Vecchia, P.
Cell detachment mediated by hyaluronic acid.
Exp. Cell Res. 137, 73-78 (1982)

2. Adams, M.H.
Bacteriophages.
Interscience Publishers, New York, 1959

3. Aisaka, K., Terada, O.
Purification and properties of lipase from Rhizopus japonicus.
J. Biochem. 89, 817-822 (1981)

4. Andersson, R.E.
Concentration and partial purification of lipase from Pseudomonas fluorescens.
Biotechnol. Lett. 2, 247-252 (1980)

5. Asbell, M.A., Eagon, R.G.
Role of multivalent cations in the organization, structure, and assembly of the cell wall of Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol. 92, 380-387 (1966)

6. Augustin, J., Freeze, H., Tejada, P., Brown, W.V.
A comparison of molecular properties of hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase from human post-heparin plasma.
J. Biol. Chem. 253, 2912-2920 (1978)

7. Balazs, E.A.
The chemistry and biology of compounds containing amino sugars.
in: The amino sugars (E.A. Balazs, R.W. Jeanloz, eds.)
Vol. 2-A, pp. 401-460, Academic Press, New York, 1965

8. Baron, S.S., Rowe, J.J.
Antibiotic action of pyocyanin.
Antimicrob. Agents Chemother. 20, 814-820 (1981)

9. Benchetrit, L.C., Pahuja, S.L., Gray, E.D., Edstrom, R.D.
A sensitive method for the assay of hyaluronidase activity.
Anal. Biochem. 79, 431-437 (1977)

10. Bengtsson, G., Olivecrona, T.
Lipoprotein lipase: Some effects of activator proteins.
Eur. J. Biochem. 106, 549-555 (1980)

11. Bengtsson, G., Olivecrona, T.
Lipoprotein lipase: Mechanism of product inhibition.
Eur. J. Biochem. 106, 557-562 (1980)

12. Bengtsson, G., Olivecrona, T., Höök, M., Riesenfeld, J., Lindahl, U.
Interaction of lipoprotein lipase with native and modified heparin-like polysaccharides.
Biochem. J. 189, 625-633 (1980)

13. Berete, Y.J.D., Schaeg, W., Brückler, J., Blobel, H.
Lipase und Phospholipase C von Staphylococcus aureus verschiedener Herkunft. I. Nachweis und Vorkommen.
Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. A 248, 229-233 (1980)

14. Berete, Y.J.D., Blobel, H., Schaeg, W., Brückler, J.
Lipase und Phospholipase C von Staphylococcus aureus verschiedener Herkunft. II. Reinigung und Charakterisierung.
Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. A 248, 234-238 (1980)

15. Berka, R.M., Gray, G.L., Vasil, M.L.
Studies of phospholipase C (heat-labile haemolysin) in Pseudomonas aeruginosa.
Infect. Immun. 34, 1071-1074 (1981)

16. Bhatti, A.R., Ingram, J.M.
The binding and secretion of alkaline phosphatase by Pseudomonas aeruginosa.
FEMS Microbiol. Lett. 13, 353-356 (1982)

17. Breatz, J.A., Heath, E.C.

The role of polysaccharide in the secretion of protein by Micrococcus sodonensis.
J. Biol. Chem. 249, 2536-2547 (1974)

18. Bradford, M.M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)

19. Braun, V., Hancock, R.E.W., Hantke, K., Hartmann, A.

Functional organisation of the outer membrane of Escherichia coli. Phage and colicin receptors as components of iron uptake systems.
J. Supramol. Struct. 5, 37-58 (1976)

20. Brown, M.R.W., Scott Foster, J.H., Clamp, J.R.

Composition of Pseudomonas aeruginosa slime.
Biochem. J. 112, 521-525 (1969)

21. Bush, M.T., Sanders-Bush, E.

Diazomethane: Improved analytical and distillation techniques for small quantities and some synthetic applications.
Anal. Biochem. 106, 351-362 (1980)

22. Castillo, F.J., Bartell, P.F.

Studies on the bacteriophage 2 receptors of Pseudomonas aeruginosa.
J. Virol. 14, 904-909 (1974)

23. Christner, J.E., Brown, M.L., Dziewiatkowski, D.D.

Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid. The role of the hyaluronic acid carboxyl groups.
Biochem. J., 167, 711-716 (1977)

24. Christner, J.E., Brown, M.L., Dziewiatkowski, D.D.

Affinity binding of the cartilage proteoglycan protein keratan sulfate core to immobilized hyaluronic acid.
Anal. Biochem. 90, 22-32 (1978)

25. Christner, J.E., Brown, M.L., Dziewiatkowski, D.D.

Interactions of cartilage proteoglycans with hyaluronate. The role of the hyaluronate acetamido groups.
J. Biol. Chem. 254, 12 303-12 305 (1979)

26. Christner, J.E., Brown, M.L., Dziewiatkowski, D.D.

Interactions of cartilage proteoglycans with hyaluronate. Inhibition of the interaction by modified oligomers of hyaluronate.
J. Biol. Chem. 254, 4624-4630 (1979)

27. Cleary, P.P., Larkin, A.

Hyaluronic acid capsule: Strategy for oxygen resistance in group A streptococci.
J. Bacteriol. 140, 1090-1097 (1979)

28. Cleland, R.L., Wang, J.L.

Ionic polysaccharides III. Dilute solution properties of hyaluronic acid fractions.
Biopolymers 9, 799-810 (1970)

29. Cleland, R.L.

Binding of hyaluronic acid oligosaccharides by cartilage proteoglycan.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 1140-1145 (1979)

30. Cleland, R.L.

Temperature dependence of binding of hyaluronate oligomer to bovine nasal proteoglycan.
Arch. Biochem. Biophys. 210, 565-572 (1981)

31. Comper, W.D., Laurent, T.C.

Physiological functions of connective tissue polysaccharides
Physiol. Rev. 58, 255-315 (1978)

32. Cowman, M.K., Balazs, E.A., Bergmann, C.W., Meyer, K.

Preparation and circular dichroism analysis of sodium hyaluronate oligosaccharides and chondroitin.
Biochemistry 20, 1379-1385 (1981)

33. Dimitracopoulos, G., Bartell, P.F.

Phage-related surface modifications of Pseudomonas aeruginosa: Effects on the biological activity of viable cells.
Infect. Immun. 23, 87-93 (1979)

34. Dimitracopoulos, G., Bartell, P.F.

Slime glycolipoproteins and the pathogenicity of various strains of Pseudomonas aeruginosa in experimental infection.
Infect. Immun. 30, 402-408 (1980)

35. Di Rienzo, J.M., Nakamura, K., Inouye, M.

The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: Biosynthesis, assembly, and functions.
Ann. Rev. Biochem. 47, 481-532 (1978)

36. Dische, Z.

A new specific color reaction of hexuronic acids.
J. Biol. Chem. 167, 189-198 (1947)

37. Dudman, W.F., Bishop, C.T.

Electrophoresis of dyed polysaccharides an cellulose acetate.
Can. J. Chem. 46, 3079-3084 (1968)

38. Emr, S.D., Hall, M.N., Silhavy, T.J.

A mechanism of protein localization: The signal hypothesis and bacteria.
J. Cell Biol. 86, 701-711 (1980)

39. Engelman, D.M., Steitz, T.A.

The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: The helical hairpin hypothesis.
Cell 23, 411-422 (1981)

40. Eveleigh, D.E., Montenecourt, B.S.

Increasing yields of extracellular enzymes.
Adv. Appl. Microbiol. 25, 57-74 (1979)

41. Ferenci, T., Boos, W.

The role of the Escherichia coli λ-receptor in transport of maltose and maltodextrins.
J. Supramol. Struct. 13, 101-116 (1980)

42. Ferenci, T., Schwentorat, M., Ullrich, S., Vilmart, J.

Lambda receptor in the outer membrane of Escherichia coli as a binding protein for maltodextrins and starch polysaccharides.
J. Bacteriol. 142, 521-526 (1980)

43. Fernandes, P.B., Kim, C., Cundy, K.R., Huang, N.N.

Antibodies to cell envelope proteins of Pseudomonas aerugino in cystic fibrosis patients.
Infect. Immun. 33, 527-532 (1981)

44. Figura, K. von, Kiowski, W., Buddecke, E.

Differently labelled glucosamine-precursor pooles for the biosynthesis of hyaluronate and heparan sulfate.
Eur. J. Biochem. 40, 89-94 (1973)

45. Finkelstein, A.E., Strawich, E.S., Sonnino, S.

Characterization and partial purification of a lipase from Pseudomonas aeruginosa.
Biochim. Biophys. Acta 206, 380-391 (1970)

46. Gardell, S.

Separation on Dowex 50 ion exchange resin of glucosamine and galactosamine and their quantitative determination.
Acta Chem. Scand. 7, 207-215 (1953)

47. Good, T.A., Bessman, S.P.

Determination of glucosamine and galactosamine using borate-buffers for modification of the Elson-Morgan and Morgan-Elson reactions.
Anal. Biochem. 9, 253-262 (1964)

48. Gray, G.W., Wilkinson, S.G.

The action of ethylenediaminetetraacetic acid on Pseudomonas aeruginosa.
J. Appl. Bacteriol. 28, 153-164 (1965)

49. Gregory, J.D.

The effect of borate on the carbazole reaction.
Arch. Biochem. Biophys. 89, 157-158 (1960)

50. Gribnau, T.C.J.

Coupling of effector-molecules to solid supports.
Dissertation, Katholische Universität Nijmegen, Niederlande, 1977

51. Guss, J.M., Hukins, D.W.L., Smith, P.J.C., Winter, W.T., Arnott, S., Moorhouse, R., Rees, D.A.

Hyaluronic acid: Molecular conformations and interactions in two sodium-salts.
J. Mol. Biol. 95, 359-384 (1975)

52. Hadler, N.M., Dourmashkin, R.R., Nermut, M.V., Williams, L.D.

Ultrastructure of a hyaluronic acid matrix.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 307-309 (1982)

53. Hancock, R.E.W., Carey, A.M.

Outer membrane of Pseudomonas aeruginosa: Heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins.
J. Bacteriol. 140, 902-910 (1979)

54. Hancock, R.E.W., Irvin, R.T., Costerton, J.W., Carey, A.M.

Pseudomonas aeruginosa outer membrane: Peptidoglycan-associated proteins.
J. Bacteriol. 145, 628-631 (1981)

55. Hancock, R.E.W., Poole, K., Benz, R.

Outer membrane protein P of Pseudomonas aeruginosa: Regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes.
J. Bacteriol. 150, 730-738 (1982)

56. Hascall, V.C., Heinegard, D.

Aggregation of cartilage proteoglycans. II. Oligosaccharide competitors of the proteoglycan-hyaluronic acid interaction.
J. Biol. Chem. 249, 4242-4249 (1974)

57. Hascall, V.C., Hascall, G.K.

Proteoglycans.
in: Cell biology of extracellular matrix (E.D. Hay, ed.), pp. 39-63, Plenum Press, New York, 1981

58. Hascall, V.C., Kimura, J.H.

Proteoglycans: Isolation and characterization.
in: Methods in enzymology (L.W. Cunningham, D.W. Frederiksen eds.), Vol. 82, pp. 769-800, Academic Press, New York, 1982

59. Hedstrom, R.C., Schockley, R.K., Eagon, R.G.

Ethylenediaminetetraacetate-extractable protein-lipopolysaccharide complex of Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol. 148, 995-997 (1981)

60. Hellsing, K.

Immune reactions in polysaccharide media.
Biochem. J. 112, 483-487 (1969)

61. Hoffmann, P., Meyer, K., Linker, A.

Transglycosylation during the mixed digestion of hyaluronic acid and chondroitin sulfate by testicular hyaluronidase.
J. Biol. Chem. 219, 653-663 (1956)

62. Holloway, B.W., Krishnapillai, V., Morgan, A.F.

Chromosomal genetics of Pseudomonas.
Microbiol. Rev. 43, 73-102 (1979)

63. Homma, J.Y.

Roles of exoenzymes and exotoxin in the pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa and the development of a new vaccine.
Japan. J. Exp. Med. 50, 149-165 (1980)

64. Ingham, E., Holland, K.T., Gowland, G., Cunliffe, W.J.

Partial purification and characterization of lipase (E.C. 3.1.1.3) from Propionibacterium acnes.
J. Gen. Microbiol. 124, 393-401 (1981)

65. Irvin, R.T., Govan, J.W.R., Fyfe, J.A.M., Costerton, J.L.
Heterogeneity of antibiotic resistance in mucoid isolates of Pseudomonas aeruginosa obtained from cystic fibrosis patients: Role of outer membrane proteins.
Antimicrob. Agents Chemother. 19, 1056-1063 (1981)

66. Iverius, P.H.
The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans.
J. Biol. Chem. 217, 2607-2613 (1972)

67. Jacoby, G.A.
Plasmids of Pseudomonas aeruginosa.
in: Pseudomonas aeruginosa: Clinical manifestations of infection and current therapy (R.G. Doggett, ed.), pp. 272-309, Academic Press, New York, 1979

68. Jäger, K.E., Winkler, U.K.
Methyl ester of hyaluronate is unable to stimulate exolipase formation by Serratia marcescens.
J. Bacteriol. 139, 1065-1067 (1979)

69. Janda, J.M., Bottone, E.J.
Pseudomonas aeruginosa enzyme profiling: Predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool.
J. Clin. Microbiol. 14, 55-60 (1981)

70. Jarrell, K., Kropinski, A.M.B.
The isolation and characterization of a lipopolysaccharide-specific Pseudomonas aeruginosa bacteriophage.
J. Gen. Virol. 33, 99-106 (1976)

71. Jarrell, K., Kropinski, A.M.B.
The chemical composition of the lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa strain PAO and a spontaneously derived rough mutant.
Microbios 19, 103-116 (1978)

72. Jerrell, K., Kropinski, A.M.B.

Isolation and characterization of a bacteriophage specific for the lipopolysaccharide of rough derivatives of Pseudomonas aeruginosa strain PAO.
J. Virol. 38, 529-538 (1981)

73. Jürgens, D., Huser, H.

Large-scale purification of staphylococcal lipase by hydrophobic interaction chromatography.
J. Chromatogr. 216, 295-301 (1981)

74. Jürgens, D., Huser, H., Brunner, H., Fehrenbach, F.J.

Purification and characterization of Staphylococcus aureus lipase.
FEMS-Microbiol. Lett. 12, 195-199 (1981)

75. Jung, D.H.

Preparation and application of procion yellow starch for amylase assay.
Clin. Chim. Acta 100, 9-11 (1980)

76. Karkhanis, Y.D., Zeltner, J.Y., Jackson, J.J., Carlo, D.J.

A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria.
Anal. Biochem. 85, 595-601 (1978)

77. Kennedy, M.B., Lennarz, W.J.

Characterization of the extracelluler lipase of Bacillus subtilis and its relationship to a membrane bound lipase found in a mutant strain.
J. Biol. Chem. 254, 1080-1089 (1979)

78. Kimura, J.H., Hardingham, T.E., Hascall, V.C., Solursh, M.

Biosynthesis of proteoglycans and their assembly into aggregates in cultures of chondrocytes from swarm rat chondrosarcoma.
J. Biol. Chem. 254, 2600-2609 (1979)

79. Knudsen, P.J., Eriksen, P.B., Fenger, M., Florentz, K.
High performance liquid chromatography of hyaluronic acid and oligosaccharides produced by bovine testicular hyaluronidase.
J. Chromatogr. 187, 373-379 (1980)

80. Koepp, L.H., Orr, T., Bartell, P.F.
Polysaccharide of the slime glycolipoprotein of Pseudomonas aeruginosa.
Infect. Immun. 33, 788-794 (1981)

81. Koepp, L.H., Orr, T., Bartell, P.F.
The lethal moiety of the surface slime glycolipoprotein of Pseudomonas aeruginosa.
Curr. Microbiol. 6, 383-387 (1981)

82. Kropinski, A.M., Chan, L.C., Jarrell, K., Milazzo, F.H.
The nature of Pseudomonas aeruginosa strain PAO bacteriophage receptors.
Can. J. Microbiol. 23, 653-658 (1977)

83. Kropinski, A.M., Chan, L.C., Milazzo, F.H.
The extraction and analysis of lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa strain PAO, and three rough mutants.
Can. J. Microbiol. 25, 390-398 (1979)

84. Kung, H., Henning, U.
Limiting availability of binding sites for dehydrogenases on the cell membrane of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 925-929 (1972)

85. Lam, J.R.C., Lam, K., Costerton, J.W.
Production of mucoid microcolonies by Pseudomonas aeruginosa within infected lungs in cystic fibrosis.
Infect. Immun. 28, 546-556 (1980)

86. Laurent, T.C., Ryan, M., Pietruszkiewicz, A.
Fractionation of hyaluronic acid - the polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body.
Biochim. Biophys. Acta 42, 476-485 (1960)

87. Laurent, T.C., Hellsing, K., Gelotte, B.

Cross-linked gels of hyaluronic acid.
Acta Chem. Scand. 18, 274-275 (1964)

88. Lindahl, U., Höök, M.

Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules.
Ann. Rev. Biochem. 47, 385-417 (1978)

89. Liu, P.V.

Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa.
J. Infect. Dis. 130, Suppl., S 94-S 99 (1974)

90. Mather, J.H., Tamplin, C.B.

A method for the determination of protein in the presence of Triton X-100.
Anal. Biochem. 93, 139-142 (1979)

91. Meyer, K.

Chemical structure of hyaluronic acid.
Fed. Proc. 17, 1075-1077 (1958)

92. Mikuni-Takagaki, Y., Toole, B.P.

Cell-substratum attachment and cell surface hyaluronate of Rous sarcoma virus-transformed chondrocytes.
J. Cell Biol. 85, 481-488 (1980)

93. Mizuno, T., Kageyama, M.

Separation and characterization of the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa.
J. Biochem. 84, 179-191 (1978)

94. Mizuno, T., Kageyama, M.

Isolation and characterization of a major outer membrane protein of Pseudomonas aeruginosa. Evidence for the occurence of a lipoprotein.
J. Biochem. 85, 115-122 (1979)

95. Morris, E.R., Rees, D.A., Welsh, E.J.

Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solution
J. Mol. Biol. 138, 383-400 (1980)

96. Nadkarni, S.R.

Studies on bacterial lipase. Part II. Study of the characteristics of partially purified lipase from Pseudomonas aeruginosa.
Enzymologia 40, 302-313 (1971)

97. Nantel, G., Bareff, G., Proulx, P.

The lipase activity of a partially purified lipolytic enzyme of Escherichia coli.
Can. J. Biochem. 56, 324-328 (1978)

98. Napier, M.A., Hadler, N.M.

Effect of calcium on structure and function of hyaluronic acid matrix: Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis and the diffusional behavior of small solutes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2261-2265 (1978)

99. Nicas, T.I., Hancock, R.E.W.

Outer membrane protein H 1 of Pseudomonas aeruginosa: Involvement in adaptive and mutational resistance to ethylenediaminetetraacetate, polymyxin B, and gentamicin.
J. Bacteriol. 143, 872-878 (1980)

100. Nieduszynski, I.A., Sheehan, J.K., Phelps, C.F.,

Hardingham, T.E., Muir, H.

Equilibrum-binding studies of pig laryngeal cartilage proteoglycans with hyaluronate oligosaccharide fractions.
Biochem. J. 185, 107-114 (1980)

101. Ögren, S., Lindahl, U.

Cleavage of macromolecular heparin by an enzyme from mouse mastocytoma.
J. Biol. Chem. 250, 2690-2697 (1975)

102. Okumura, S., Iwai, M., Tsujisaka, Y.

The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase.
Agric. Biol. Chem. 45, 185-189 (1981)

103. Osborn, M.J., Wu, H.C.P.

Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria.
Ann. Rev. Microbiol. 34, 369-422 (1980)

104. Pan, Y.T., Mitchell, M., Elbein, A.D.

Studies on the trehalose-phosphate synthase of Mycobacterium smegmatis: Binding of heparin to the enzyme.
Arch. Biochem. Biophys. 186, 392-400 (1978)

105. Pines, O., Gutnick, D.L.

Relationship between phage resistance and emulsan production, interaction of phages with the cell-surface of Acinetobacter calcoaceticus.
Arch. Microbiol. 130, 129-133 (1981)

106. Proulx, P., Nantel, G., Baraff, G.

Partial purification of a lipolytic enzyme from Escherichia coli.
Can. J. Biochem. 56, 319-323 (1978)

107. Reed, S.M., Northcote, D.H.

Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein.
Anal. Biochem. 116, 53-64 (1981)

108. Richman, P.G., Baer, H.

A convenient plate assay for the quantitation of hyaluronidase in Hymenopters venoms.
Anal. Biochem. 109, 376-381 (1980)

109. Roberts, N.A., Gray, G.W., Wilkinson, S.G.

The bacterizidal action of ethylenediaminetetraacetic acid on Pseudomonas aeruginosa.
Microbios 2, 189-208 (1970)

110. Roden, L., Baker, J.R., Cifonelli, A., Mathews, M.B.
Isolation and characterization of connective tissue polysaccharides.
in: Methods in enzymology (S.P. Colowick, N.O. Kaplan, eds.), Vol. 28, pp. 73-140, Academic Press, New York, 1972

111. Roy, R.N.
Fluorimetric assay of the activity of extracellular lipases of Pseudomonas fluorescens and Serratia marcescens.
J. Appl. Bacteriol. 49, 265-271 (1980)

112. Royle, P.L., Matsumoto, H., Holloway, B.W.
Genetic circularity of the Pseudomonas aeruginosa PAO chromosome.
J. Bacteriol. 145, 145-155 (1981)

113. Schulte, G., Bohne, L., Winkler, U.K.
Glycogen and various other polysaccharides stimulate the formation of exolipase by Pseudomonas aeruginosa.
Can. J. Microbiol., in press (1982)

114. Scott, J.E., Tigwell, M.J.
Perjodate oxidation and the shapes of glycosaminoglycuronans in solution.
Biochem. J., 173, 103-114 (1978)

115. Scott, J.E., Heatley, F.
^{1}H-nuclear-magnetic-resonance spectra of the methyl group of the acetamido moiety and the structure of acidic glycosaminoglycans in solution.
Biochem. J. 181, 445-449 (1979)

116. Scott, J.E., Heatley, F., Moorcroft, D., Olavesen, A.H.
Secondary structures of hyaluronate and chondroitin sulphates.
Biochem. J. 199, 829-832 (1981)

117. Sheehan, J.K., Gardner, K.H., Atkins, E.D.T.
Hyaluronic acid: A double-helical structure in the presence of potassium at low pH and found also with the cations ammonium, rubidium, and caesium.
J. Mol. Biol. 117, 113-135 (1977)

118. Shimada, E., Matsumura, G.

Viscosity and molecular weights of hyaluronic acids.
J. Biochem. 78, 513-517 (1975)

119. Shimada, E., Matsumura, G.

Degradation process of hyaluronic acid by Streptomyces hyaluronidase.
J. Biochem. 88, 1015-1023 (1980)

120. Shinozaki, T., Fujii, R., Sanai, Y., Homma, J.Y.

Development of antibodies to oep, exotoxin A and exoenzymes of Pseudomonas aeruginosa in man.
Japan. J. Exp. Med. 51, 165-170 (1981)

121. Shoemaker, D.P., Garland, G.W., Steinfeld, J.J.

Experiments in physical chemistry.
Mc-Grew-Hill, New York, 1974

122. Smith, R.F., Willett, N.P.

Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms.
Appl. Microbiol. 16, 1434-1436 (1968)

123. Sokol, P.A., Iglewski, B.H., Hager, T.A., Sadoff, J.C., Cross, A.S., McManus, A., Farber, B.F., Iglewski, W.J.

Production of exoenzyme S by clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa.
Infect. Immun. 34, 147-153 (1981)

124. Stinnett, J.D., Eagon, R.G.

A model system for studying protein-lipopolysaccharide synthesis, assembly, and insertion in the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa.
Can. J. Microbiol. 21, 1834-1841 (1975)

125. Sugahara, K., Schwartz, N.B., Dorfman, A.

Biosynthesis of hyaluronic acid by Streptococcus.
J. Biol. Chem. 254, 6252-6261 (1979)

126. Tengblad, A.

Affinity chromatography on immobilized hyaluronate and its application to the isolation of hyaluronate binding proteins from cartilage.
Biochim. Biophys. Acta 578, 281-289 (1979)

127. Tombs, M.B., Blake, G.G.

Stability and inhibition of Aspergillus and Rhizopus lipases.
Biochim. Biophys. Acta 700, 81-89 (1982)

128. Underhill, C.B., Toole, B.P.

Binding of hyaluronate to the surface of cultured cells.
J. Cell Biol. 82, 475-484 (1979)

129. Underhill, C.B., Toole, B.P.

Physical characteristics of hyaluronate binding to the surface of Simian Virus 40 - transformed 3T3 cells.
J. Biol. Chem. 255, 4544-4549 (1980)

130. Underhill, C.B., Toole, B.P.

Receptors for hyaluronate on the surface of parent and virus - transformed cell lines.
Exp. Cell Res. 131, 419-423 (1981)

131. Verger, R.

Enzyme kinetics of lipolysis.
in: Methods in enzymology (S.P. Colowick, N.O. Kaplan, eds.), Vol. 64 - B, pp. 340-392, Academic Press, New York, 1980

132. Welsh, E.J., Rees, D.A., Morris, E.R., Madden, J.K.

Competitive inhibition evidence for specific intermolecular interactions in hyaluronate solutions.
J. Mol. Biol. 138, 375-382 (1980)

133. Welti, D., Rees, D.A., Welsh, E.J.

Solution conformation of glycosaminoglycans: Assignment of the 300-MHz ^{1}H-magnetic resonance spectra of chondroitin-4-sulphate, chondroitin-6-sulphate, and hyaluronate, and investigation of an alkali-induced conformation change.
Eur. J. Biochem. 94, 505-514 (1979)

134. Wickner, W.

The assembly of proteins into biological membranes: The membrane trigger hypothesis.
Ann. Rev. Biochem. 48, 23-45 (1979)

135. Wilkinson, S.G.

Sensitivity to ethylenediaminetetraacetic acid.
in: Resistance of Pseudomonas aeruginosa (M.R.W. Brown, ed.), pp. 145-188, John Wiley & Sons, London, 1975

136. Wilkinson, S.G.

^{31}P-nmr evidence for the presence of triphosphate residues in lipopolysaccharides from Pseudomonas aeruginosa.
Biochem. J. 199, 833-835 (1981)

137. Winkler, U.K., Stuckmann, M.

Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccherides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia mercescens.
J. Bacteriol. 138, 663-670 (1979)

138. Winter, W.T., Smith, P.J.C., Arnott, S.

Hyaluronic acid: Structure of a fully extended 3-fold helical sodium salt and comparison with the less extended 4-fold helical forms.
J. Mol. Biol. 99, 219-235 (1975)

139. Winter, W.T., Arnott, S.

Hyaluronic acid: The role of divalent cations in conformation and packing.
J. Mol. Biol. 117, 761-784 (1977)

140. Wretlind, B., Hedén, L., Sjöberg, L., Wadström, T.

Production of enzymes and toxins by hospital strains of Pseudomonas aeruginosa in relation to serotype and phage-typing pattern.
J. Med. Microbiol. 6, 91-100 (1973)

141. Wretlind, B., Sjöberg, L., Wadström, T.

Protease-deficient mutants of Pseudomonas aeruginosa: Pleiotropic changes in activity of other extracellular enzyme
J. Gen. Microbiol. 103, 329-336 (1977)

Lebenslauf

31.07.1954	geboren in Dortmund
1961 - 1964	Besuch der Volksschule Wellinghofen in Dortmund
1964 - 1972	Besuch des Max-Planck-Gymnasiums in Dortmund
18.05.1972	Reifeprüfung
13.10.1972	Immatrikulation an der Ruhr-Universität Bochum für die Fächer Biologie und Chemie
06.04.1976	Zwischenprüfung im Fach Chemie
05.10.1976	Zwischenprüfung im Fach Biologie
15.12.1978	Erste Philologische Staatsprüfung in den Fächern Biologie und Chemie
seit 01.02.1979	Wissenschaftlicher Assistent m.d.V.b. am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen der Ruhr-Universität Bochum

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353